

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391513** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.23

(51) Int. Cl. **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.11.18

(54) АНТИТЕЛА К MARCO И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **63/115,272; 63/244,662**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.11.18; 2021.09.15**

Джечен Надин, Стрели Мишель,

(33) **US**

Ян Си, Лян Линда, Срирам

(86) **PCT/US2021/059955**

Венкатараман, Поллак Джошуа,

(87) **WO 2022/109178 2022.05.27**

Юрич Владислава, Хэгблом Линнея,

(71) Заявитель:

Мохика Кара, Преста Леонард Г.,

ПАЙОНИР

Митра Саянтан (US)

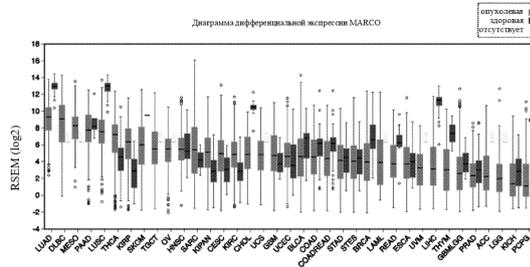
ИММУНОТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.

(74) Представитель:

(US)

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе представлены антитела к MARCO. Также представлены способы получения и применения антител к MARCO.



A1

202391513

202391513

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578309EA/023

АНТИТЕЛА К MARCO И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет и преимущество по заявке США № 63/115272, поданной 18 ноября 2020 г., и заявке США № 63/244662, поданной 15 сентября 2021 г., каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, который был подан через EFS-Web и включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная в XX, 20XX, называется XXXXXUS_sequencelisting.txt и имеет размер XXXXXXX байтов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Популяции миелоидных клеток микроокружения опухоли включают моноциты и нейтрофилы (иногда не совсем точно сгруппированные как миелоидные супрессорные клетки), макрофаги и дендритные клетки. Хотя внутриопухолевые миелоидные популяции в целом долгое время считались нестимулирующими или супрессорными, в последнее время было признано, что не все инфильтрирующие опухоль миелоидные клетки одинаковы.

Рецептор макрофагов с коллагеновой структурой (MARCO, также известный как SCARA2; см. HGNC: 6895 и NCBI: NM_006770.3, доступные 8 мая 2020 г. на веб-сайте NCBI; включено в данный документ посредством ссылки для всех целей) относится к семейству рецепторов-мусорщиков класса А и экспрессируется на перитонеальных макрофагах, а также в субпопуляции макрофагов в селезенке и лимфатических узлах (см. Hirano S, PLoS ONE 2015; 10(11): e0142062). Недавние исследования выявили MARCO в качестве специфического маркера TAM при злокачественном новообразовании у человека (Lavin et al., Cell; 2017; 169(4) 750-765). MARCO опосредует интернализацию макрофагами неопсонизированных частиц и микроорганизмов, таких как бактерии (см. Jing J, J Immunol 2013;190:(12) 6360-6367). Недавно было показано, что MARCO участвует в TLR-индуцированном ответе экспрессии генов в дендритных клетках и может играть роль в воспалительном иммунном ответе (Kissick HT, PLoS ONE 2014; 9(8):2104148).

Существует неудовлетворенная потребность в новых подходах к лечению рака, которые включают избирательное удаление, перепрограммирование или активацию миелоидных клеток, которые неэффективны при стимуляции ответов иммунных клеток (например, Т-клеток или НК-клеток), тем самым усиливая иммунный ответ в микроокружении опухоли.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В некоторых аспектах в данном документе предложены выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с человеческим рецептором макрофагов с коллагеновой структурой (MARCO) (SEQ ID NO: 384).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с богатым цистеином доменом рецептора-мусорщика (SRCR) (остатки 424-519 SEQ ID NO: 384) из MARCO человека.

В некоторых аспектах в данном документе предложены выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с богатым цистеином доменом рецептора-мусорщика (SRCR) (остатки 424-519 SEQ ID NO: 384) из человеческого рецептора макрофагов с коллагеновой структурой (MARCO) (SEQ ID NO: 384).

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и последовательность варибельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, при этом: CDR-H1 включает последовательность GFSLTSYHVS (SEQ ID NO: 2), CDR-H2 включает последовательность AIWTGGSIA (SEQ ID NO: 3), CDR-H3 включает последовательность DLSDYSSYTSFDY (SEQ ID NO: 4), CDR-L1 включает последовательность ASEGISNDLA (SEQ ID NO: 431) или XASEGISNDLA (SEQ ID NO: 383), где X представляет собой аргинин (R) или лейцин (L), CDR-L2 включает последовательность AASRLQD (SEQ ID NO: 8), и CDR-L3 включает последовательность QQSYKYPLT (SEQ ID NO: 9).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с одним из следующих остатков: Q452, Y472, K473, E450, Q487, T499, H505, D507, S509 или E511 из MARCO (SEQ ID NO: 384).

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат химерное, человеческое, гуманизованное или крысиное антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность ASEGISNDLA (SEQ ID NO: 431).

В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность RASEGISNDLA (SEQ ID NO: 27).

В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность LASEGISNDLA (SEQ ID NO: 7).

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 61.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 111.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 434, 444, и 474.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 66.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 116.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VL включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 57, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 439, 449, и 479.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 61; и последовательность VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 66.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 111; и последовательность VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 116.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 434, 444, и 474, и последовательность VL включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 57, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 439, 449, и 479.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 434, 444, и 474, и/или последовательность VL включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 57, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 439, 449, и 479.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 115.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 5, 15, 125, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 145, 438, 448, и 478.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 120.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность легкой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 6, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 443, 453, и 483.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 65; и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 70.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 115; и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 120.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 5, 15, 125, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 145, 438, 448 и 478; и последовательность легкой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 6, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 443, 453 и 483.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 5, 15, 125, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 145, 438, 448, и 478; и/или последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 6, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 443, 453, и 483.

В некоторых аспектах в данном документе предложены выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с MARCO человека (SEQ ID NO: 384), содержащие последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2, и CDR-H3, и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, при этом: CDR-H1 включает последовательность GYTFTDYAVN (SEQ ID NO: 232), CDR-H2 включает последовательность WINTQTGKPT (SEQ ID NO: 233), CDR-H3 включает последовательность DSYYYSSSLDY (SEQ ID NO: 234), CDR-L1 включает последовательность ASAGISNDLA (SEQ ID NO: 432) или XASAGISNDLA (SEQ ID NO: 381), где X представляет собой аргинин (R) или лейцин (L), CDR-L2 включает последовательность AASRLQD (SEQ ID NO: 238), и CDR-L3 включает последовательность QQSYKYPWT (SEQ ID NO: 239).

В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность ASAGISNDLA (SEQ ID NO: 432).

В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность RASAGISNDLA (SEQ ID NO: 317).

В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность LASAGISNDLA (SEQ ID NO: 237).

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 454.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 241, 311, 321, 331, 341, 351, 454 и 464.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 459.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VL включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 246, 316, 326, 336, 346, 356, 459, и 469.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 454; и последовательность VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 459.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 241, 311, 321, 331, 341, 351, 454, и 464, и последовательность VL включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 246, 316, 326, 336, 346, 356, 459, и 469.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 241, 311, 321, 331, 341, 351, 454, и 464; и/или последовательность VL включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 246, 316, 326, 336, 346, 356, 459, и 469.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 458.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 245, 315, 325, 335, 345, 355, 458, и 468.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 463.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность легкой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 250, 320, 330, 340, 350, 360, 463, и 473.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 458; и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 463.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 245, 315, 325, 335, 345, 355, 458 и 468; и последовательность легкой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 250, 320, 330, 340, 350, 360, 463 и 473.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 245, 315, 325, 335, 345, 355, 458, и 468; и/или последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 250, 320, 330, 340, 350, 360, 463 и 473.

В некоторых аспектах в данном документе предложены выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с MARCO человека (SEQ ID NO: 384), содержащие последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, при этом: CDR-H1 включает последовательность KFTFSNYGMN (SEQ ID NO: 142), CDR-H2 включает последовательность LIYYNSNNKY (SEQ ID NO: 143), CDR-H3 включает последовательность SLTGGSDYFDS (SEQ ID NO: 144), CDR-L1 включает последовательность ASKSIGTFLA (SEQ ID NO: 433) или XASKSIGTFLA (SEQ ID NO: 382), где X представляет собой аргинин (R) или лизин (K), CDR-L2 включает последовательность SGSTLQS (SEQ ID NO: 148), и CDR-L3 включает последовательность QQHDEYPFT (SEQ ID NO: 149).

В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность ASKSIGTFLA (SEQ ID NO: 433).

В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность KASKSIGTFLA (SEQ ID NO: 147).

В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность RASKSIGTFLA (SEQ ID NO: 157).

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, и 221.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VL включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, и 226.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, и 221 и последовательность VL включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, и 226.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в

SEQ ID NO: 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, и 221, и/или последовательность VL включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, и 226.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 145, 155, 165, 175, 185, 195, 205, 215 и 225.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность легкой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220 и 230.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 145, 155, 165, 175, 185, 195, 205, 215 и 225, и последовательность легкой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, и 230.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, включающую последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 145, 155, 165, 175, 185, 195, 205, 215 и 225, и/или последовательность легкой цепи, включающую последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, и 230.

В еще одном аспекте в данном документе предложены выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с MARCO человека (SEQ ID NO: 384), содержащие последовательность варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и последовательность варибельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где: CDR-H1 включает последовательность GYTFTDYHL (SEQ ID NO: 252), CDR-H2 включает последовательность YINPNNAYTS (SEQ ID NO: 253), CDR-H3 включает последовательность DTTDYVNLHFAY (SEQ ID NO: 254), CDR-L1 включает последовательность LTSEGISNDLA (SEQ ID NO: 257), CDR-L2 включает последовательность DASRLED (SEQ ID NO: 258), и CDR-L3 включает последовательность QQSYKYPLT (SEQ ID NO: 259).

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 251 или 261.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VL включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 256 или 266.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 251 или 261, а последовательность VL включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 256 или 266.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98 или 99% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 251 или 261, и/или последовательность VL включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98 или 99% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 256 или 266.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 255 или 265.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 260 или 270.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 255 или 265; и последовательность легкой цепи, указанную SEQ ID NO: 260 или 270.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, включающую последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 255 или 265; и последовательность легкой цепи, включающую последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 260 или 270.

В еще одном аспекте в данном документе предложены выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с MARCO человека (SEQ ID NO: 384), содержащие последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где: CDR-H1 включает последовательность GFSLTSYTLS (SEQ ID NO: 362), CDR-H2 включает последовательность AIWGGDNTD (SEQ ID NO: 363), CDR-H3 включает последовательность ELGGSFDY (SEQ ID NO: 364), CDR-L1 включает последовательность KTSQNINKKLD (SEQ ID NO: 367), CDR-L2 включает последовательность YTNNLQT (SEQ ID NO: 368), и CDR-L3 включает последовательность YQYDSGFT (SEQ ID NO: 369).

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 361 или 371.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VL включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 366 или 376.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 361 или 371, и последовательность VL включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 366 или 376.

В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98 или 99% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 361 или 371, и/или последовательность VL включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98 или 99% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 366 или 376.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 365 или 375; и последовательность легкой цепи, указанную SEQ ID NO: 370 или 380.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, включающую последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, или 99% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 365 или 375; и последовательность легкой цепи, включающую последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 370 или 380.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело, нейтральное антитело, антагонистическое антитело, агонистическое антитело, поликлональное антитело, афукозилированное антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, полноразмерное антитело и scFv.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой scFv.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой гуманизированное антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область Fc.

В некоторых вариантах осуществления область Fc включает область Fc человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит активную область Fc человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит человеческую константную область тяжелой цепи класса, выбранного из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи человека класса IgG и подкласса, выбранного из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

В некоторых вариантах осуществления область Fc человека содержит область Fc IgG1 человека дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления область Fc человека содержит область Fc IgG4 человека дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления область Fc содержит одну или более аминокислотных замен, при этом одна или более замен приводят к увеличению времени полужизни антитела, повышению активности АЗКЦ, повышению активности АЗКФ, повышению активности КЗЦ, снижению активности АЗКЦ, снижению активности АЗКФ или снижению активности КЗЦ по сравнению с областью Fc без одной или более замен.

В некоторых вариантах осуществления область Fc связывает рецептор Fcγ, выбранный из группы, состоящей из: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa и FcγRIIIb.

В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с MARCO человека с KD менее или равной около 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, или 7×10^{-9} M, по данным анализа методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В некоторых вариантах осуществления связывание антитела с MARCO человека зависит от двухвалентного катиона.

В некоторых вариантах осуществления связывание антитела с MARCO человека не зависит от двухвалентного катиона.

В некоторых вариантах осуществления двухвалентный катион включает Ca²⁺ или Mg²⁺.

В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с внеклеточным доменом MARCO человека.

[0100] В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с растворимым MARCO.

[0101] В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с доменом SRCR MARCO человека, MARCO яванского макака или MARCO человека и яванского макака.

[0102] В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с доменом SRCR (остатки 424-519 SEQ ID NO: 384) MARCO человека.

[0103] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с по меньшей мере одной из: Q452, Y472, K473, E450, Q487, T499, H505, D507, S509 или E511 из MARCO (SEQ ID NO: 384).

[0104] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность, блокирующей рецептор-лиганд.

[0105] В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует повышенную экспрессию по меньшей мере одного цитокина или хемокина при контакте с клетками по сравнению с изотипическим контрольным антителом, необязательно измеренную с помощью анализа нуклеиновой кислоты или белка.

[0106] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один цитокин или хемокин содержит по меньшей мере один из IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL7R, IL-12, IL12-p70, IL-15, IL-18, IL-27, IP-10, IFN-γ, TNFα, MIP1-α, MIP1-β, MIP-2, CSF2, CSF3, G-

CSF, M-CSF, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CCL24, CXCL1, CXCL3, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, gro-альфа, MCP-1, MCP-3, LIF, или зотаксина.

[0107] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело индуцирует повышенную активацию NK-клеток, регуляцию В-клеток, пролиферацию Т-клеток, активацию Т-клеток или дифференцировку Т-клеток по сравнению с изотипическим контрольным антителом, необязательно измеренную с помощью анализа нуклеиновой кислоты или белка.

[0108] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело индуцирует сигналинг IL-2-STAT5, сигналинг NF-kB, сигналинг TLR, сигналинг адгезии и подвижности, сигналинг перестройки цитоскелета, сигналинг TNF α через NF-kB, сигналинг IL-6-JAK-STAT3, сигналинг SYK, сигналинг MAPK, сигналинг TPL2, кальциевый сигналинг, ответ IFN γ или ответ IFN α по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0109] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело подавляет путь клеточного цикла, выживаемость клеток, клеточную адгезию, путь мишени Мус, путь мишеней E2F, гипоксию, сигнальный путь mTOR, сигнальный путь PI3K-AKT, сигнальный путь Src, сигнальный путь PKC, сигнальный путь эпителиально-мезенхимального перехода, окислительное фосфорилирование или сигнальный путь MAPK по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0110] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело индуцирует активацию инфламмасом, что определяется секрецией IL-1 β и/или IL-18 и/или фагоцитозом по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0111] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело индуцирует реполяризацию миелоидных M2-подобных TAMs в M1-подобные ассоциированные с опухолью макрофаги (TAM) и/или реполяризацию mMDSC в провоспалительные моноциты по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0112] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело увеличивает количество CD8 $^+$ Т-клеток, CD4 $^+$ Т-клеток, NK-клеток, дендритных клеток, MHCII $^+$ макрофагов, MHCII $^{\text{high}}$ моноцитов или MHCII $^{\text{mid}}$ моноцитов по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0113] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело увеличивает количество макрофагов, макрофагов маргинальной зоны, фолликулярных В-клеток и/или макрофагов красной пульпы в селезенке по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0114] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело снижает количество TAM, ассоциированных с опухолью нейтрофилов, В-клеток плазмы, В-клеток маргинальной зоны, CD19 $^+$ В-клеток, MHCII $^-$ моноцитов и/или MHCII $^-$ макрофагов по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0115] В некоторых вариантах осуществления антитело при введении субъекту индуцирует повышенный противоопухолевый вторичный ответ по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0116] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой MARCO+ клетку.

[0117] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой человеческую MARCO+ клетку.

[0118] В некоторых вариантах осуществления MARCO+ клетка представляет собой моноцит, моноцитарную клетку-супрессор миелоидного происхождения (mMDSC) или макрофаг.

[0119] В некоторых вариантах осуществления макрофаг представляет собой ассоциированный с опухолью макрофаг (TAM), или моноцитарный макрофаг (MDM).

[0120] В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с MARCO на поверхности MARCO+ клетки.

[0121] В некоторых вариантах осуществления антитело: конкурирует за связывание с MARCO человека с гуманизированным антителом PI-HX-3011, PI-HX-3031, PI-HX-3043, PI-HX-3061, PI-HX-3092; связывается с MARCO человека; связывается с MARCO яванского макака; связывается с MARCO человека и яванского макака; связывается с доменом SRCR MARCO человека; связывается с доменом SRCR MARCO яванского макака; связывается с доменом SRCR MARCO человека и яванского макака; связывается с MARCO человека или яванского макака зависимым от двухвалентного катиона образом; связывается с MARCO человека или яванского макака независимым от двухвалентного катиона образом; стимулирует сигналинг MARCO при связывании с MARCO+ клеткой; индуцирует один или более иммунных сигнальных путей при связывании с MARCO+ клеткой; индуцирует секрецию цитокина или хемокина при связывании с MARCO+ клеткой, необязательно при этом цитокин или хемокин представляет собой IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL7R, IL-12, IL12-p70, IL-15, IL-18, IL-27, IP-10, IFN- γ , TNF α , MIP1- α , MIP1- β , MIP-2, CSF2, CSF3, G-CSF, M-CSF, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CCL24, CXCL1, CXCL3, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, gro-альфа, MCP-1, MCP-3, LIF, или эотаксин; индуцирует повышенную активацию NK-клеток, регуляцию В-клеток, пролиферацию Т-клеток, активацию Т-клеток или дифференцировку Т-клеток при связывании с MARCO+ клеткой; индуцирует сигналинг IL-2-STAT5, сигналинг NF-kB, сигналинг TLR, сигналинг адгезии и подвижности, сигналинг перестройки цитоскелета, сигналинг TNF α через NF-kB, сигналинг IL-6-JAK-STAT3, сигналинг SYK, сигналинг MAPK, сигналинг TPL2, кальциевый сигналинг, ответ IFN γ , или ответ IFN α ; снижает путь клеточного цикла, выживаемость клеток, клеточную адгезию, путь мишени Мус, путь мишеней E2F, гипоксию, сигнальный путь mTOR, сигнальный путь PI3K-AKT, сигнальный путь Src, сигнальный путь PKC, сигнальный путь эпителиально-мезенхимального перехода, окислительное фосфорилирование или сигнальный путь MAPK; индуцирует активацию инфламмосом, определяемую секрецией IL-1 β и/или IL-18 и/или фагоцитозом; индуцирует

реполяризацию миелоидных M2-подобных TAM в M1-подобные TAM и/или реполяризацию mMDSC в провоспалительные моноциты; модулирует В-клетки в селезенке при связывании с MARCO+ клеткой; увеличивает количество CD8+ Т-клеток, CD4+ Т-клеток, NK-клеток, дендритных клеток, MHCII+ макрофагов, MHCIIhigh моноцитов и/или MHCIImid моноцитов в селезенке и/или опухоли; увеличивает количество макрофагов, макрофагов маргинальной зоны, фолликулярных В-клеток и/или макрофагов красной пульпы в селезенке и/или опухоли; уменьшает количество TAM, ассоциированных с опухолью нейтрофилов, В-клеток плазмы, В-клеток маргинальной зоны, CD19+ В-клеток, MHCII- моноцитов и/или MHCII- макрофагов в селезенке и/или опухоли; индуцирует изменения в клеточной адгезии, цитоскелете, хемотаксисе и миграции клеток при связывании с MARCO+ клеткой; индуцирует клеточные сигнальные пути, включающие пути адгезии, миграции, хемотаксиса, клеточного цикла, Т-клеточного рецептора, фагоцитоза, аутофагии и путь wnt при связывании с MARCO+ клеткой; отключает MARCO+ миелоидные клетки; или способно к любой комбинации выше.

[0122] В некоторых вариантах осуществления антитело предназначено для применения в качестве лекарственного препарата.

[0123] В некоторых вариантах осуществления антитело предназначено для лечения рака или инфекции.

[0124] В некоторых вариантах осуществления антитело предназначено для лечения рака, при этом рак выбран из солидной опухоли и гемобластоза.

[0125] В другом аспекте в данном документе предложены выделенные полинуклеотиды или наборы полинуклеотидов, кодирующие антитело, описанное в данном документе, его VH, его VL, его легкую цепь, его тяжелую цепь или его антигенсвязывающую часть; необязательно выделенный полинуклеотид или набор полинуклеотидов представляет собой кДНК.

[0126] В еще одном аспекте в данном документе представлены векторы или набор векторов, содержащий полинуклеотид или набор полинуклеотидов.

[0127] В еще одном аспекте в данном документе предложены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид или набор полинуклеотидов, или вектор, или набор векторов.

[0128] В еще одном аспекте в данном документе предложены способы получения антитела, включающие экспрессию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с клеткой-хозяином и выделение экспрессированного антитела.

[0129] В еще одном аспекте в данном документе предложены фармацевтические композиции, содержащие выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0130] В еще одном аспекте в данном документе предложены наборы, содержащие выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическую композицию, и инструкции по применению.

[0131] В другом аспекте в данном документе предложены способы усиления иммунного ответа у субъекта, включающие введение субъекту композиции, содержащей антитело к MARCO человека или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0132] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит антитело, которое связывается с доменом SRCR (остатки 424-519 SEQ ID NO: 384) MARCO человека.

[0133] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит выделенное антитело или фармацевтическую композицию.

[0134] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность, блокирующей рецептор-лиганд.

[0135] В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ.

[0136] В некоторых вариантах осуществления повышенный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.

[0137] В некоторых вариантах осуществления повышенный иммунный ответ включает повышенную экспрессию по меньшей мере одного цитокина или хемокина клеткой по сравнению с изотипическим контрольным антителом, необязательно измеренную с помощью анализа нуклеиновой кислоты или белка.

[0138] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один цитокин или хемокин содержит по меньшей мере один из IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL7R, IL-12, IL12-p70, IL-15, IL-18, IL-27, IP-10, IFN- γ , TNF α , MIP1- α , MIP1- β , MIP-2, CSF2, CSF3, G-CSF, M-CSF, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CCL24, CXCL1, CXCL3, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, GRO-альфа, MCP-1, MCP-3, LIF, или эотаксина.

[0139] В некоторых вариантах осуществления повышенный иммунный ответ включает повышенную активацию NK-клеток, регуляцию В-клеток, пролиферацию Т-клеток, активацию Т-клеток или дифференцировку Т-клеток по сравнению с изотипическим контрольным антителом, необязательно измеренную с помощью анализа нуклеиновой кислоты или белка.

[0140] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело индуцирует. В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело индуцирует сигналинг IL-2-STAT5, сигналинг NF-kB, сигналинг TLR, сигналинг адгезии и подвижности, сигналинг перестройки цитоскелета, сигналинг TNF α через NF-kB, сигналинг IL-6-JAK-STAT3, сигналинг SYK, сигналинг MAPK, сигналинг TPL2, кальциевый сигналинг, ответ IFN γ или ответ IFN α по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0141] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело подавляет путь клеточного цикла, выживаемость клеток, клеточную адгезию, путь мишени Мус, путь мишеней E2F, гипоксию, сигнальный путь mTOR, сигнальный путь PI3K-AKT, сигнальный путь Src, сигнальный путь PKC, сигнальный путь эпителиально-

мезенхимального перехода, окислительное фосфорилирование или сигнальный путь МАРК по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0142] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело индуцирует активацию инфламмасом, что определяется секрецией IL-1 β и/или IL-18 и/или фагоцитозом по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0143] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело индуцирует реполяризацию миелоидных M2-подобных TAM в M1-подобные TAM и/или реполяризацию mMDSC в провоспалительные моноциты по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0144] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело увеличивает количество CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, NK-клеток, дендритных клеток, MHCII⁺ макрофагов, MHCII^{high} моноцитов или MHCII^{mid} моноцитов по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0145] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело увеличивает количество макрофагов, макрофагов маргинальной зоны, фолликулярных В-клеток и/или макрофагов красной пульпы в селезенке по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0146] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело снижает количество TAM, ассоциированных с опухолью нейтрофилов, В-клеток плазмы, В-клеток маргинальной зоны, CD19⁺ В-клеток, MHCII⁻ моноцитов и/или MHCII⁻ макрофагов по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0147] В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует усиленный вторичный иммунный ответ.

[0148] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой MARCO⁺ клетку.

[0149] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой человеческую MARCO⁺ клетку.

[0150] В некоторых вариантах осуществления MARCO⁺ клетки представляют собой моноцит, моноцитарную клетку-супрессор миелоидного происхождения (mMDSC) или макрофаг.

[0151] В некоторых вариантах осуществления макрофаг представляет собой ассоциированный с опухолью макрофаг (TAM), или моноцитарный макрофаг (MDM).

[0152] В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с MARCO на клеточной поверхности MARCO⁺ клетки.

[0153] В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

[0154] В некоторых вариантах осуществления субъект имеет рак.

[0155] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидный рак.

[0156] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз.

[0157] В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из: рака легкого, аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака почки, рака печени, почечно-клеточного рака, рака шейки матки, рака яичников, колоректального рака, рака толстой кишки, нейробластомы, рака молочной железы, трижды негативного рака молочной железы, базальноподобного рака молочной железы, рака желудка, рака желудка, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака кожи, лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, неходжкинской лимфомы, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака эндометрия, рака головы и шеи или плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSC).

[0158] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак толстой кишки, рак молочной железы, базальноподобный рак молочной железы, рак яичников или рак желудка.

[0159] В некоторых вариантах осуществления MARCO экспрессируется на более высоком уровне на иммунной клетке, которая находится в пределах опухоли, по сравнению с иммунной клеткой, которая находится вне опухоли.

[0160] В некоторых вариантах осуществления IL-10 экспрессируется на более высоком уровне на иммунной клетке, которая находится в пределах опухоли, по сравнению с иммунной клеткой, которая находится вне опухоли.

[0161] В еще одном аспекте в данном документе предложены способы лечения рака у субъекта, включающие введение субъекту композиции, содержащей антитело к MARCO человека или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0162] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит антитело, которое связывается с доменом SRCR (остатки 424-519 SEQ ID NO: 384) MARCO человека.

[0163] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит описанное в данном документе антитело или его фармацевтическую композицию.

[0164] В еще одном аспекте в данном документе предложены способы лечения рака у субъекта, включающие введение субъекту композиции, содержащей антитело к MARCO человека или его антигенсвязывающий фрагмент, или их фармацевтической композиции.

[0165] В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал, одновременно получает или впоследствии получит иммунотерапию.

[0166] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия включает в себя по меньшей мере одно из следующего: ингибитор контрольной точки; ингибитор контрольной точки Т-клеток; и антитело к PD1.

[0167] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия включает антитело к PD1.

[0168] В другом аспекте в данном документе предложены способы лечения рака у субъекта, включающие введение субъекту композиции, содержащей антитело к MARCO человека или его антигенсвязывающий фрагмент, и иммунотерапии.

[0169] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит антитело, которое связывается с доменом SRCR (остатки 424-519 SEQ ID NO: 384) MARCO человека.

[0170] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит описанное в данном документе антитело или его фармацевтическую композицию.

[0171] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия включает в себя по меньшей мере одно из следующего: ингибитор контрольной точки; ингибитор контрольной точки Т-клеток; и антитело к PD1.

[0172] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия включает антитело к PD1.

[0173] В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

[0174] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидный рак.

[0175] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз.

[0176] В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из: рака легкого, аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака почки, рака печени, почечно-клеточного рака, рака шейки матки, рака яичников, колоректального рака, рака толстой кишки, нейробластомы, рака молочной железы, трижды негативного рака молочной железы, базальноподобного рака молочной железы, рака желудка, рака желудка, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака кожи, лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, неходжкинской лимфомы, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака эндометрия, рака головы и шеи или плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSC).

[0177] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак толстой кишки, рак молочной железы, базальноподобный рак молочной железы, рак яичников или рак желудка.

[0178] В некоторых вариантах осуществления MARCO экспрессируется на более высоком уровне на иммунной клетке, которая находится в пределах опухоли, по сравнению с иммунной клеткой, которая находится вне опухоли.

[0179] В некоторых вариантах осуществления IL-10 экспрессируется на более высоком уровне на иммунной клетке, которая находится в пределах опухоли, по сравнению с иммунной клеткой, которая находится вне опухоли.

[0180] В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует повышенный противоопухолевый вторичный иммунный ответ по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0181] В некоторых вариантах осуществления введение усиливает иммунный ответ у субъекта по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0182] В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ.

[0183] В некоторых вариантах осуществления повышенный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.

[0184] В некоторых вариантах осуществления повышенный иммунный ответ включает экспрессию по меньшей мере одного цитокина или хемокина клеткой по сравнению с изотипическим контрольным антителом, необязательно измеряемую с помощью анализа нуклеиновой кислоты или белка.

[0185] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один цитокин или хемокин содержит по меньшей мере один из IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL7R, IL-12, IL12-p70, IL-15, IL-18, IL-27, IP-10, IFN- γ , TNF α , MIP1- α , MIP1- β , MIP-2, CSF2, CSF3, G-CSF, M-CSF, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CCL24, CXCL1, CXCL3, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, GRO-альфа, MCP-1, MCP-3, LIF, или эотаксина.

[0186] В некоторых вариантах осуществления повышенный иммунный ответ включает повышенную активацию NK-клеток, регуляцию В-клеток, пролиферацию Т-клеток, активацию Т-клеток или дифференцировку Т-клеток по сравнению с изотипическим контрольным антителом, необязательно измеренную с помощью анализа нуклеиновой кислоты или белка.

[0187] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело индуцирует сигналинг IL-2-STAT5, сигналинг NF-kB, сигналинг TLR, сигналинг адгезии и подвижности, сигналинг перестройки цитоскелета, сигналинг TNF α через NF-kB, сигналинг IL-6-JAK-STAT3, сигналинг SYK, сигналинг MAPK, сигналинг TPL2, кальциевый сигналинг, ответ IFN γ или ответ IFN α по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0188] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело подавляет путь клеточного цикла, выживаемость клеток, клеточную адгезию, путь мишени Мус, путь мишеней E2F, гипоксию, сигнальный путь mTOR, сигнальный путь PI3K-AKT, сигнальный путь Src, сигнальный путь PKC, сигнальный путь эпителиально-мезенхимального перехода, окислительное фосфорилирование или сигнальный путь MAPK по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0189] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело индуцирует активацию инфламмасом, что определяется секрецией IL-1 β и/или IL-18 и/или фагоцитозом по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0190] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело индуцирует реполяризацию миелоидных M2-подобных TAM в M1-подобные TAM и/или реполяризацию mMDSC в провоспалительные моноциты по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0191] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело увеличивает количество CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, NK-клеток, дендритных клеток, MHCII⁺ макрофагов, MHCII^{high} моноцитов или MHCII^{mid} моноцитов по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0192] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело увеличивает количество макрофагов, макрофагов маргинальной зоны, фолликулярных В-клеток и/или макрофагов красной пульпы в селезенке по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0193] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело снижает количество TAM, ассоциированных с опухолью нейтрофилов (TAN), В-клеток плазмы, В-клеток маргинальной зоны, CD19⁺ В-клеток, MHCII⁻ моноцитов и/или MHCII⁻ макрофагов по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0194] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой MARCO⁺ клетку.

[0195] В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой человеческую MARCO⁺ клетку.

[0196] В некоторых вариантах осуществления MARCO⁺ клетка представляют собой моноцит, моноцитарную клетку-супрессор миелоидного происхождения (mMDSC) или макрофаг.

[0197] В некоторых вариантах осуществления макрофаг представляет собой ассоциированный с опухолью макрофаг (TAM), или моноцитарный макрофаг (MDM).

[0198] В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с MARCO на клеточной поверхности MARCO⁺ клетки.

[0199] В еще одном аспекте в данном документе предложены способы инактивации миелоидных клеток, которые экспрессируют MARCO на клеточной поверхности, включающие приведение миелоидных клеток в контакт с антителом к MARCO человека или его антигенсвязывающим фрагментом.

[0200] В другом аспекте в данном документе предложены способы инактивации миелоидных клеток, которые экспрессируют MARCO на клеточной поверхности, включающие приведение миелоидных клеток в контакт с антителом, описанным в данном документе, или его фармацевтической композицией.

[0201] В некоторых вариантах осуществления антитело инактивирует миелоидные клетки посредством по меньшей мере одного из активности АЗКЦ, активности КЗЦ или активности АЗКФ, необязательно при этом антитело инактивирует миелоидные клетки посредством активности АЗКЦ, необязательно при этом антитело инактивирует миелоидные клетки посредством активности КЗЦ, и необязательно, при этом антитело инактивирует миелоидные клетки посредством активности АЗКФ.

[0202] В некоторых вариантах осуществления миелоидная клетка представляет собой MARCO⁺ клетку.

[0203] В некоторых вариантах осуществления миелоидная клетка представляет собой MARCO+ клетку человека.

[0204] В некоторых вариантах осуществления миелоидная клетка представляет собой моноцит, моноцитарную клетку-супрессор миелоидного происхождения (mMDSC) или макрофаг.

[0205] В некоторых вариантах осуществления макрофаг представляет собой ассоциированный с опухолью макрофаг (TAM), или моноцитарный макрофаг (MDM).

[0206] В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки представляют собой внутриопухолевые или селезеночные миелоидные клетки.

[0207] В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт осуществляют *in vitro* или *in vivo*.

[0208] В некоторых вариантах осуществление приведение в контакт происходит *in vivo* у субъекта, необязательно при этом указанный субъект имеет рак.

[0209] В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

[0210] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидный рак.

[0211] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз.

[0212] В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из: рака легкого, аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака почки, рака печени, почечно-клеточного рака, рака шейки матки, рака яичников, колоректального рака, рака толстой кишки, нейробластомы, рака молочной железы, трижды негативного рака молочной железы, базальноподобного рака молочной железы, рака желудка, рака желудка, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака кожи, лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, неходжкинской лимфомы, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака эндометрия, рака головы и шеи или плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSC).

[0213] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак толстой кишки, рак молочной железы, базальноподобный рак молочной железы, рак яичников или рак желудка.

[0214] В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт повышает иммунный ответ у субъекта по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0215] В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ.

[0216] В некоторых вариантах осуществления повышенный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.

[0217] В некоторых вариантах осуществления повышенный иммунный ответ включает экспрессию по меньшей мере одного цитокина или хемокина клеткой по

сравнению с изотипическим контрольным антителом, необязательно измеряемую с помощью анализа нуклеиновой кислоты или белка.

[0218] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один цитокин или хемокин содержит по меньшей мере один из IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL7R, IL-12, IL12-p70, IL-15, IL-18, IL-27, IP-10, IFN- γ , TNF α , MIP1- α , MIP1- β , MIP-2, CSF2, CSF3, G-CSF, M-CSF, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CCL24, CXCL1, CXCL3, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, GRO-альфа, MCP-1, MCP-3, LIF, или эотаксина.

[0219] В некоторых вариантах осуществления повышенный иммунный ответ включает повышенную активацию NK-клеток, регуляцию В-клеток, пролиферацию Т-клеток, активацию Т-клеток или дифференцировку Т-клеток по сравнению с изотипическим контрольным антителом, необязательно измеренную с помощью анализа нуклеиновой кислоты или белка.

[0220] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело индуцирует сигналинг IL-2-STAT5, сигналинг NF-kB, сигналинг TLR, сигналинг адгезии и подвижности, сигналинг перестройки цитоскелета, сигналинг TNF α через NF-kB, сигналинг IL-6-JAK-STAT3, сигналинг SYK, сигналинг MAPK, сигналинг TPL2, кальциевый сигналинг, ответ IFN γ или ответ IFN α по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0221] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело подавляет путь клеточного цикла, выживаемость клеток, клеточную адгезию, путь мишени Мус, путь мишеней E2F, путь гипоксии, сигнальный путь mTOR, сигнальный путь PI3K-AKT, сигнальный путь Src, сигнальный путь PKC, сигнальный путь эпителиально-мезенхимального перехода, окислительное фосфорилирование или сигнальный путь MAPK по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0222] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело индуцирует активацию инфламмосом, что определяется по секреции IL-1 β и/или IL-18 и/или фагоцитозу.

[0223] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело индуцирует реполяризацию миелоидных M2-подобных TAM в M1-подобные TAM и/или реполяризацию mMDSC в провоспалительные моноциты.

[0224] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело увеличивает количество CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, NK-клеток, дендритных клеток, MHCII⁺ макрофагов, MHCII^{high} моноцитов или MHCII^{mid} моноцитов по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0225] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело увеличивает количество макрофагов, макрофагов маргинальной зоны, фолликулярных В-клеток и/или макрофагов красной пульпы в селезенке по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0226] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело снижает количество TAM, ассоциированных с опухолью нейтрофилов, В-клеток плазмы,

В-клеток маргинальной зоны, CD19+ В-клеток, МНСII- моноцитов и/или МНСII- макрофагов по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0227] В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал, одновременно получает или впоследствии получит иммунотерапию.

[0228] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия включает в себя по меньшей мере одно из следующего: ингибитор контрольной точки; ингибитор контрольной точки Т-клеток; и антитело к PD1.

[0229] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия включает антитело к PD1.

[0230] В некоторых вариантах осуществления определение уровня экспрессии белка MARCO в образце, взятом у субъекта, включает приведение образца в контакт с антителом к MARCO и проведение иммуногистохимического анализа или анализа растворимого MARCO.

[0231] В некоторых вариантах осуществления анализ представляет собой иммуногистохимический анализ, и антитело включает RDM5, RDM9, PI-3010.15, PI-3010.25 или PI-3030.41.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0232] Эти и другие особенности, аспекты и преимущества данного изобретения станут более понятными с учетом следующего описания и прилагаемых графических материалов, на которых:

[0233] **На Фиг. 1** показана упорядоченная экспрессия мРНК MARCO в опухоли (левая полоса) по сравнению с нормальной (правая полоса) тканью.

[0234] **На Фиг. 2** показано, что экспрессию РНК MARCO индуцировали IL-10 в моноцитарных макрофагах (MDM).

[0235] **На Фиг. 3А** показана корреляция экспрессии MARCO и IL-10 в различных типах опухолей. **На Фиг. 3В** показана тепловая карта корреляции между экспрессией TREM2, экспрессией CD45, экспрессией IL-10 и экспрессией MARCO.

[0236] **На Фиг. 4А** показано, что экспрессия MARCO обратно коррелирует с вероятностью выживания пациента при CRC. **На Фиг. 4В** показано, что экспрессия MARCO обратно коррелирует с вероятностью выживания пациента при RCC. **На Фиг. 4С** показано, что экспрессия MARCO обратно коррелирует с вероятностью выживания пациента при нейробластоме. **На Фиг. 4D** показано, что экспрессия MARCO увеличивалась в зависимости от степени тяжести заболевания при нейробластоме в соответствии со стадией по системе INSS.

[0237] **На Фиг. 5** показано, что экспрессия MARCO повышается при базальноподобном раке молочной железы по сравнению с другими подтипами рака молочной железы.

[0238] **На Фиг. 6А** показано связывание 33 антител к MARCO человека с контрольными клетками GFP-239Т (левая полоса), клетками, экспрессирующими MARCO человека, (средняя полоса) или клетками, экспрессирующими MARCO мыши (правая

полоса). На **Фиг. 6B** показаны гистограммы для проточной цитометрии одного антитела к MARCO, PI-M014, связывающегося с клетками, экспрессирующими huMARCO, muMARCO и CytoMARCO, по сравнению с контрольными клетками (контроль GFP). На **Фиг. 6C** показано титрование PI-M014 и изотипического контрольного антитела, связывающихся с клетками, экспрессирующими huMARCO. На **Фиг. 6D** показана гистограмма проточной цитометрии связывания PI-M014 с моноцитарными макрофагами человека.

[0239] На **Фиг. 7** показаны сводные данные по анализу конкурентного связывания и то, что PI-M015 и PI-M017 конкурировали друг с другом за связывание с антигеном MARCO, что указывает на то, что они связывались с одним и тем же эпитопом MARCO.

[0240] На **Фиг. 8A** показано, что MARCO экспрессируется в MDM человека. На **Фиг. 8B** показано, что MARCO экспрессируется в ассоциированных с опухолью макрофагах (TAM) из образцов первичной опухоли человека (рака желудка и рака яичников).

[0241] На **Фиг. 9** показано, что RDM-9514 также блокирует связывание ЛПНП с MARCO дозозависимым образом.

[0242] На **Фиг. 10A** показано, что RDM-9514 связывается с экспрессированным на поверхности MARCO на МНСII^{high} TAM и МНСII^{low} TAM, выделенных из опухолей CT26 и опухолей Py8119. На **Фиг. 10B** показано, что MARCO экспрессируется на TAM и моноцитах в модели сингенной опухоли CT26.

[0243] На **Фиг. 11A** показано, что антитела к MARCO мыши PI-NX-3017 (левая полоса, переименовано в PI-3009), PI-NX-3016 (средняя левая полоса, переименовано в PI-3008), PI-NX-3021 (средняя правая полоса, переименовано в PI-3007) и PI-NX-3012 (правая полоса), каждый из которых связан с BMMDM мыши. На **Фиг. 11B** показано, что те же самые антитела также связывались с MARCO на TAM (правая полоса) и моноцитах (левая полоса), выделенных из опухолей в модели сингенной опухоли CT26 (n=2).

[0244] На **Фиг. 12** показан объем опухоли в группах мышей, получавших лечение изотипическим антителом; только антителом к PD-1; или PI-3008 с антителом к PD-1, PI-3007 с антителом к PD-1, PI-3009 с антителом к PD-1 и PI-3007 с антителом к PD-1.

[0245] На **Фиг. 13A** показаны объемы опухолей у отдельных мышей, получавших изотипическое контрольное антитело. На **Фиг. 13B** показаны объемы опухолей у отдельных мышей, получавших лечение антителом к PD-1. На **Фиг. 13C** показаны объемы опухолей у отдельных мышей, получавших PI-3008 и антитело к PD-1. На **Фиг. 13D** показаны объемы опухолей у отдельных мышей, получавших PI-3009 и антитело к PD-1. На **Фиг. 13E** показаны объемы опухолей у отдельных мышей, получавших изотипическое контрольное антитело. На **Фиг. 13F** показаны объемы опухолей у отдельных мышей, получавших фукозилированное PI-3008. На **Фиг. 13G** показаны объемы опухолей у отдельных мышей, получавших афукозилированное PI-3008. На **Фиг. 13H** показаны объемы опухолей у мышей, получавших указанное антитело. На **Фиг. 13I** показаны объемы опухолей у мышей, получавших указанное антитело. На **Фиг. 13J** показан

процент ингибирования роста опухоли (%TGI) у мышей, получавших изотипическое контрольное антитело (дикий Fc), по сравнению с диким Fc PI-3008 и антителом к PD-1. На **Фиг. 13К** показан процент ингибирования роста опухоли (%TGI) у мышей, получавших изотипическое контрольное антитело (эффекторный нефункциональный Fc), по сравнению с PI-3021 с нефункциональным Fc и антителом к PD-1.

[0246] На **Фиг. 14** показан объем опухоли реимплантированных опухолевых клеток CT26 и клеток EMT6 у мышей, которых предварительно лечили антителами к MARCO и к PD-1.

[0247] На **Фиг. 15А** показана временная шкала ФД исследования. На **Фиг. 15В** показан объем опухоли CT26 у мышей, получавших лечение изотипическим антителом или PI-3008. На **Фиг. 15С** показано количественное определение антитела PI-3008 у мышей после первой и второй дозы.

[0248] На **Фиг. 16А** показана экспрессия провоспалительной молекулы в TME мышей с CT26, получавших PI-3008. На **Фиг. 16В** показано сравнение генов, экспрессия которых повысилась в опухолях BMDM и CT26 после лечения PI-3008 *in vitro* или *in vivo*.

[0249] На **Фиг. 17А** показано сравнение последовательности VH PI-NX-3061 с каркасной последовательностью VH человека и тремя гуманизованными последовательностями VH, основанными на PI-NX-3061. На **Фиг. 17В** показано сравнение последовательности VL PI-NX-3061 с каркасной последовательностью VL человека и одной гуманизованной последовательностью VL на основе PI-NX-3061.

[0250] На **Фиг. 18** показано сравнение последовательности VL PI-NX-3031 с каркасной последовательностью VL человека и 6 гуманизованными последовательностями VL на основе PI-NX-3031.

[0251] На **Фиг. 19** показана средняя геометрическая интенсивность флуоресценции (гСИФ) клеток, инкубированных с антителами к MARCO и бактериями с флуоресценцией AF488 в конкурентном анализе. Предварительная инкубация клеток с антителами к MARCO снижала связывание бактерий и флуоресцентный сигнал дозозависимым образом.

[0252] На **Фиг. 20А** показано связывание химерных антител, связанных с клетками 293Т, сверхэкспрессирующими MARCO, но не с иммунными клетками, присутствующими в PBL (лейкоцитах периферической крови). Связывание с эозинофилами было неспецифическим для всех протестированных антител, включая изотипический контроль hIgG1. PI-3010 показан слева, PI-3030 показан слева посередине, PI-3031 показан справа посередине, а изотипический контроль hIgG1 показан справа. На **Фиг. 20В** показано связывание PI-NX-3031 с TAM и моноцитами из рака эндометрия (первичная опухоль человека). Связывание антитела - правый пик, связывание изотипического контроля - левый пик.

[0253] На **Фиг. 21** показано сравнение последовательностей домена SRCR дикого типа в MARCO человека и мыши и мутаций, сделанных в указанных мышинных и человеческих рекомбинантных вариантных белках.

[0254] **На Фиг. 22** показаны аминокислотные остатки домена SRCR дикого типа в MARCO человека и мыши, а также мутации, сделанные в указанных рекомбинантных вариантах белках.

[0255] **На Фиг. 23** показано связывание указанного антитела с рекомбинантным человеческим белком SRCR MARCO hVar3.

[0256] **На Фиг. 24** показан перекрывающийся остаток эпитопа SRCR (обведен) в мышином SRCR (слева, Q452) и человеческом SRCR (справа, D452).

[0257] **На Фиг. 25А** показана стандартная калибровочная ФК кривая для PI-3025. **На Фиг. 25В** показана стандартная калибровочная ФК кривая для PI-3048.

[0258] **На Фиг. 26А** показан профиль концентрации PI-3025 и PI-3048 в зависимости от времени в ФК анализе связывания лиганда. **На Фиг. 26В** показан профиль зависимости концентрации PI-3025 и PI-3048 от времени в общем ФК анализе.

[0259] **На Фиг. 27** показана экспрессия цитокинов и других соответствующих генов (MIP-1 α , IL-27, LIF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IP-10, IL-6, IL-10, CD40, IL-12p70, G-CSF, IFN γ , GM-CSF, TNF α , MIP-1 β , MCP-1, MIG, gro-alpha, IL-1 α , IL-15, MCP-3, M-CSF, и VEGF-A) в hMDM из двух разных доноров после лечения антителом к MARCO.

[0260] **На Фиг. 28** представлены данные экспрессии мРНК согласно кПЦР для указанных генов после обработки PI-3010.15, PI-3010.25, PI-3030.41 или контролем hIgG1.

[0261] **На Фиг. 29** показано, что мкАт к MARCO человека и мыши обеспечивают сходную регуляцию путей.

[0262] **На Фиг. 30** показаны основные гены и пути иммунной активации, усиливаемые антителом к MARCO в hDTC, включая сигналинг IL-2-STAT5, сигналинг TNF α через NF-kB, сигналинг IL-6-JAK-STAT3, воспалительный ответ, ответ IFN γ и ответ IFN α .

[0263] **На Фиг. 31** показано, что PI-3010.15 индуцирует провоспалительную характеристику в макрофагах-супрессорах человека (M2c).

[0264] **На Фиг. 32** представлено сравнение указанного кратного изменения экспрессии цитокинов, индуцированного PI-3010.15 и PI-3030.41.

[0265] **На Фиг. 33А** показано, что PI-3008 индуцирует статистически значимую секрецию IL-1 β инфламмасомой в неполяризованных макрофагах мышей C57BL/6. **На Фиг. 33В** показано, что PI-3008 индуцирует статистически значимую секрецию IL-1 β инфламмасомой в поляризованных по IL-10 макрофагах мышей C57BL/6. **На Фиг. 33С** показано, что PI-3008 индуцирует статистически значимую секрецию IL-1 β инфламмасомой в неполяризованных макрофагах мышей Balb/c. **На Фиг. 33D** показано, что PI-3008 индуцирует статистически значимую секрецию IL-1 β инфламмасомой в поляризованных IL-10 макрофагах мышей Balb/c.

[0266] **На Фиг. 34А** показано, что PI-3025 (формат IgG1) и PI-3048 (формат IgG4) индуцировали статистически значимую секрецию IL-1 β в макрофагах, поляризованных IL-10, после инкубации с 0,1 мкг/мл ЛПС+АТФ и 1 мкг/мл LSP+АТФ. **На Фиг. 34В** показано, что PI-3048 индуцирует секрецию IL-1 β после обработки 1 мкг/мл ЛПС+АТФ.

Столбцы для PI-3025 показаны вторыми слева в каждой группе, столбцы для PI-3048 показаны справа в каждой группе.

[0267] **На Фиг. 35** показано, что PI-3010.15, PI-3010.25 и PI-3030.41 индуцировали выработку IL-1 β при обработке ЛПС и АТФ по сравнению с условиями без обработки

[0268] **На Фиг. 36** показано, что PI-3008 продемонстрировало противоопухолевую активность в виде отдельного агента в модели ЕМТ6. Объемы опухолей у мышей, получавших контрольное изотипическое антитело, показаны на правой панели, объемы опухолей у мышей, получавших лечение антителом PI-3008, показаны на левой панели. Мышей, получавших PI-3008, распределяли в группы отвечающих на лечение и не отвечающих на лечение животных.

[0269] **На Фиг. 37** показано, что PI-3008 продемонстрировало противоопухолевую активность в виде отдельного агента в модели E0771. Объемы опухолей у мышей, получавших изотипическое контрольное антитело, показаны на верхней правой и нижней правой панелях, объемы опухолей у мышей, получавших антитело к PD-1, показаны на верхней левой панели, а объемы опухолей у мышей, получавших антитело PI-3008, показаны на нижней левой панели.

[0270] **На Фиг. 38А** показано, что у мышей, которым вводили PI-3008, наблюдалось статистически значимое уменьшение объема опухоли по сравнению с изотипическими контролями ($p=0,0037$). **На Фиг. 38В** показан процент ингибирования роста опухоли (TGI) для изотипического антитела и PI-3008. **На Фиг. 38С** показано, что PI-3008 и эффекторно нефункциональное PI-3021 обладают противоопухолевой активностью в модели E0771.

[0271] **На Фиг. 39А** представлена схема временной шкалы исследования ФД/ФК/эффективности E0771. **На Фиг. 39В** показан объем опухоли у мышей, которым вводили изотипический контроль, и мышей, получавших PI-3008, в ходе исследования. **На Фиг. 39С** представлены отдельные объемы опухолей у мышей, получавших изотипический контроль. **На Фиг. 39D** представлены объемы отдельных опухолей у мышей, получавших PI-3008. **На Фиг. 39Е** представлены конечные объемы опухоли на 28-й день. **На Фиг. 39F** представлены уровни PI-3008 в сыворотке.

[0272] **На Фиг. 40А** представлены концентрации PI-3008 в сыворотке в моно- и комбинированных экспериментах с антителом к PD-1. **На Фиг. 40В** представлены концентрации антитела к PD-1 в сыворотке в комбинированных экспериментах.

[0273] **На Фиг. 41А** представлены ИГХ-изображения CD8 Т-клеток и NCR1 (NK-клеток), окрашенных DAB после введения изотипического контроля или PI-3008. **На Фиг. 41В** представлена количественная оценка инфильтрации воспалительных моноцитов (CD8+ Т-клетки, NCR1+ NK-клетки) с помощью проточной цитометрии. **На Фиг. 41С** представлена количественная оценка МНСII^{High} Ly6C+ моноцитов, инфильтрации DC и NK-клеток NK1.1 с помощью проточной цитометрии. **На Фиг. 41D** представлена количественная оценка CD206+ клеток, MARCO+ клеток, NCR1+ клеток и CD8a+ клеток в указанной области.

[0274] **На Фиг. 42А** представлены уровни экспрессии указанных провоспалительных цитокинов и хемокинов, индуцированных PI-3008, в супернатантах опухоли модели E0771. **На Фиг. 42В** представлены уровни экспрессии указанных цитокинов, связанные с активацией Т-клеток и активацией NK-клеток, наблюдаемые в 1 день после введения дозы 2 в супернатантах опухоли.

[0275] **На Фиг. 43** представлены результаты анализа занятости рецептора.

[0276] **На Фиг. 44А** представлена количественная оценка указанных типов клеток в селезенке после лечения изотипическим контрольным антителом или PI-3008. **На Фиг. 44В** представлен количественный анализ указанных типов клеток в селезенке после лечения изотипическим контрольным антителом или PI-3008. **На Фиг. 44С** представлена количественная оценка указанных типов клеток в селезенке после лечения изотипическим контрольным антителом или PI-3008. **На Фиг. 44D** представлена количественная оценка указанных типов клеток в селезенке после лечения изотипическим контрольным антителом или PI-3008. На каждой фигуре образцы для изотипа показаны слева от пар, образцы для PI-3008 показаны справа от пар.

[0277] **На Фиг. 45** представлено количественное определение указанных типов иммуноглобулинов в селезенке и сыворотке после лечения изотипическим контрольным антителом или PI-3008.

[0278] **На Фиг. 46** представлена количественная оценка MARCO-положительных клеток в селезенке после второй дозы и в конце исследования после лечения изотипическим контрольным антителом или PI-3008.

[0279] **На Фиг. 47А** представлена количественная оценка указанного типа клеток в селезенке после лечения изотипическим контрольным антителом или PI-3008. **На Фиг. 47В** представлено количественное определение указанного типа клеток в селезенке после лечения изотипическим контрольным антителом или PI-3008. **На Фиг. 47С** представлена количественная оценка указанного типа клеток в селезенке после лечения изотипическим контрольным антителом или PI-3008. **На Фиг. 47D** представлено количественное определение указанного типа клеток в селезенке после лечения изотипическим контрольным антителом или PI-3008.

[0280] **На Фиг. 48А** представлено количественное определение процента положительных клеток на тканевой компартмент в селезенке после лечения изотипическим контрольным антителом или PI-3008. **На Фиг. 48В** представлено количественное определение процента положительных клеток на тканевой компартмент в селезенке после лечения изотипическим контрольным антителом или PI-3008. **На Фиг. 48С** представлено количественное определение процента положительных клеток на тканевой компартмент в селезенке после лечения изотипическим контрольным антителом или PI-3008. **На Фиг. 48D** представлено количественное определение процента положительных клеток на тканевой компартмент в селезенке после лечения изотипическим контрольным антителом или PI-3008. На каждой фигуре образцы для изотипа показаны слева от пар, образцы для PI-3008 показаны справа от пар.

[0281] На **Фиг. 49** показано, что PI-3008 индуцировало увеличение числа CD8+ Т-клеток и маркера цитотоксичности гранзима В, что измерялось с помощью ИГХ, по сравнению с животными с опухолями, получавшими изотипический контроль.

[0282] На **Фиг. 50** показаны изменения уровней MARCO на макрофагах маргинальной зоны в селезенке с заметными промежутками в области маргинальной зоны при окрашивании ИГХ-совместимым отличным от PI-3008 конкурирующим антителом к MARCO мыши.

[0283] На **Фиг. 51А** показаны репрезентативные изображения ткани колоректальной опухоли (слева) и ткани опухоли легкого (справа), окрашенной 2,5 мкг/мл RDM5 с использованием условий демаскировки эпитопов с высоким рН (ER2) на верхних панелях. На нижних панелях представлены репрезентативные изображения биоптатов нормальной ткани легкого, селезенки и печени, окрашенных 2,5 мкг/мл RDM5 с использованием условий демаскировки эпитопов с высоким рН (ER2). Темно-голубой цвет указывает на положительное окрашивание миелоидных клеток, экспрессирующих MARCO. На **Фиг. 51В** показан процент положительных по MARCO случаев рака для указанного типа рака после ИГХ окрашивания антителом RDM5. На **Фиг. 51С** показан балл ИГХ для указанного типа рака после ИГХ окрашивания антителом RDM5.

[0284] На **Фиг. 52** показано, что связывание некоторых антител к MARCO с MARCO зависело от кальция.

[0285] На **Фиг. 53** показано связывание указанного антитела MARCO с линиями клеток, экспрессирующими MARCO человека и яванского макака.

[0286] На **Фиг. 54** показано связывание антител, полученных методом стабильной трансфекции, с клетками, экспрессирующими MARCO, по сравнению с эталонными антителами, полученными посредством транзientной трансфекции.

[0287] На **Фиг. 55А** показана калибровочная кривая sMARCO для RG-3000А. На **Фиг. 55В** показаны уровни sMARCO в нормальных образцах сыворотки крови и образцах сыворотки крови человека со злокачественным новообразованием.

[0288] На **Фиг. 56** показаны объемы опухолей у мышей с дефицитом В-клеток после лечения антителом к MARCO, антителом к PD-1, комбинацией или изотипическим антителом.

[0289] На **Фиг. 57** показана активность репортера NF-kB, индуцированная PI-3010.15 или изотипическим антителом в комбинации с указанным агонистом через 4 часа или 24 часа.

[0290] На **Фиг. 58** показано, что лечение PI-3008 индуцировало указанные цитокины и хемокины в опухолях в модели E0771 в ранние временные точки.

[0291] На **Фиг. 59** показано, что лечение PI-3008 индуцировало указанные цитокины и хемокины в селезенке в модели E0771 в ранние временные точки.

[0292] На **Фиг. 60** представлена количественная оценка указанных типов миелоидных клеток опухоли на 2-й и 5-й день после введения изотипического контрольного антитела или PI-3008.

[0293] **На Фиг. 61** представлена количественная оценка указанных типов миелоидных клеток опухоли на 2-й и 5-й день после введения изотипического контрольного антитела или PI-3008.

[0294] **На Фиг. 62** представлена количественная оценка указанных типов миелоидных клеток опухоли на 2-й и 5-й день после введения изотипического контрольного антитела или PI-3008.

[0295] **На Фиг. 63** представлена количественная оценка указанных типов опухолевых лимфоидных клеток на 2-й и 5-й день после введения изотипического контрольного антитела или PI-3008.

[0296] **На Фиг. 64** представлена количественная оценка указанных типов лимфоидных клеток селезенки на 5-й день после введения изотипического контрольного антитела или PI-3008.

[0297] **На Фиг. 65** представлена количественная оценка указанных типов лимфоидных или миелоидных клеток селезенки на 5-й день после введения изотипического контрольного антитела или PI-3008.

[0298] **На Фиг. 66** представлена количественная оценка указанных типов миелоидных клеток селезенки на 5-й день после введения изотипического контрольного антитела или PI-3008.

[0299] **На Фиг. 67** представлена количественная оценка указанных типов миелоидных клеток селезенки на 5-й день после введения изотипического контрольного антитела или PI-3008.

[0300] **На Фиг. 68** представлена количественная оценка указанных типов миелоидных клеток селезенки на 5-й день после введения изотипического контрольного антитела или PI-3008.

[0301] **На Фиг. 69** представлен количественный анализ указанных типов клеток в крови на 5-й день после введения изотипического контрольного антитела или PI-3008.

[0302] **На Фиг. 70** показано, что занятость рецепторов терапевтическим антителом к MARCO была достигнута в клетках, экспрессирующих MARCO, в селезенке и опухолях.

[0303] **На Фиг. 71** показано, что PI-3010.15 индуцирует экспрессию указанных провоспалительных цитокинов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

[0304] Термины, используемые в формуле изобретения и описании, определяются так, как изложено ниже, если не указано иное.

[0305] Термин «облегчение» относится к любому терапевтически положительному результату лечения патологического состояния, например, онкологического заболевания, включая его профилактику, уменьшение степени тяжести или прогрессирования, достижение ремиссии или излечение.

[0306] Термин «in situ» относится к процессам, которые возникают в живой клетке, растущей отдельно от живого организма, например, растущей в культуре ткани.

[0307] Термин «in vivo» относится к процессам, происходящим в живом организме.

[0308] Применяемый в данном документе термин «млекопитающее» включает как людей, так и отличных от людей субъектов, и включает без ограничения людей, отличных от людей приматов, собак, кошек, мышей, крупный рогатый скот, лошадей и свиней.

[0309] Термин «процент идентичности» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновой кислоты или полипептида относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые имеют определенный процент одинаковых нуклеотидов или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, как измерено с использованием одного из алгоритмов сравнения последовательностей, описанных ниже (например, BLASTP и BLASTN или другие алгоритмы, доступные специалистам) или при визуальном осмотре. В зависимости от применения процент «идентичности» может наблюдаться в области сравниваемой последовательности, например, в функциональном домене, или, альтернативно, существовать по всей длине двух сравниваемых последовательностей.

[0310] Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность служит эталонной последовательностью с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости, обозначают координаты последовательности и указывают программные параметры алгоритма для работы с последовательностями. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности последовательностей для исследуемой последовательности(-ей) по сравнению с эталонной последовательностью на основании программных параметров.

[0311] Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии согласно Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), алгоритма гомологического выравнивания согласно Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), поиск по методу сходства согласно Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), путем компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA, и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин), или путем визуального осмотра (см. в целом Ausubel et al., ниже).

[0312] Одним из примеров алгоритма, который подходит для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, является алгоритм BLAST, который описан в Altschul et al. *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является общедоступным через Национальный центр биотехнологической информации (ncbi.nlm.nih.gov/).

[0313] Термин «достаточное количество» означает количество, достаточное для получения желаемого эффекта, например, количество, достаточное для модулирования агрегации белка в клетке.

[0314] Термин «терапевтически эффективное количество» означает количество, которое эффективно для облегчения симптома заболевания. Терапевтически эффективное количество может быть «профилактически эффективным количеством», поскольку профилактика может считаться терапией.

[0315] Сокращения, используемые в этой заявке, включают следующее:

[0316] Следует отметить, что используемые в описании изобретения и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не указывает иное.

Антитела

Структура

[0317] В настоящей заявке предложены антитела и композиции, содержащие антитело, которое связывает белок MARCO. Такие антитела включают антитела, которые увеличивают, усиливают или индуцируют иммунные ответы или убивают, инактивируют или истощают миелоидные клетки.

[0318] Термин «антитело» используется в данном документе в самом широком смысле и включает определенные типы молекул иммуноглобулинов, содержащих один или более антигенсвязывающих доменов, которые специфически связываются с антигеном или эпитопом. Антитело, в частности, включает интактные антитела (например, интактные иммуноглобулины), фрагменты антител и полиспецифические антитела.

[0319] Распознанные гены иммуноглобулинов включают гены константных областей каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эпсилон и мю, а также множество генов переменных областей иммуноглобулинов. Легкие цепи классифицируют на каппа или лямбда. «Класс» антитела или иммуноглобулина относится к типу константного домена или константной области, содержащейся в его тяжелой цепи. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, и IgA₂. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно.

[0320] Структурная единица иллюстративного иммуноглобулина (антитела) состоит из двух пар полипептидных цепей, каждая пара содержит одну «легкую» цепь (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь иммуноглобулина (около 50-70 кДа), например, гомодимер спаренных легкой цепи и тяжелой цепи. N-концевой домен каждой цепи определяет переменную область от около 100 до 110 или более аминокислот, в основном ответственных за распознавание антигена. Термины переменный легкой цепи (VL) и переменный тяжелой цепи (VH) относятся к этим доменам легкой и тяжелой цепи, соответственно. Тяжелая цепь IgG₁ содержит, соответственно от N- до C-конца, домены VH, CH1, CH2 и CH3. Легкая цепь содержит домены VL и CL от N- до C-конца. Тяжелая цепь IgG₁ содержит шарнир между доменами CH1 и CH2. В определенных вариантах осуществления иммуноглобулиновые конструкции содержат по меньшей мере один домен

иммуноглобулина из IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, связанный с терапевтическим полипептидом. В некоторых вариантах осуществления домен иммуноглобулина, обнаруженный в антителе, представленном в данном документе, получен из конструкции на основе иммуноглобулина, такой как диатело или наноантитело, или получен из нее. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновые конструкции, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере один домен иммуноглобулина из антитела, состоящего из тяжелых цепей, такого как верблюжье антитело. В некоторых вариантах осуществления иммуноглобулиновые конструкции, представленные в данном документе, содержат по меньшей мере один домен иммуноглобулина из антитела млекопитающего, такого как антитело крупного рогатого скота, антитело человека, верблюжье антитело, антитело мыши или любое химерное антитело.

[0321] В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в данном документе, содержат тяжелую цепь. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgA. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgD. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgE. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgG. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgM. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgG1. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgG2. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgG3. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgG4. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgA1. В одном варианте осуществления тяжелая цепь представляет собой тяжелую цепь IgA2.

[0322] Используемый в данном документе термин «гипервариабельная область» или «HVR» относится к каждой из областей вариабельного домена антитела, являющихся гипервариабельными по последовательности и/или образующих структурно определенные петли («гипервариабельные петли»). Как правило, нативные четырехцепочечные антитела содержат шесть HVR: три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). HVR обычно содержат аминокислотные остатки из гипервариабельных петель и/или из «определяющих комплементарность областей» (CDR), причем последние характеризуются высочайшей изменчивостью последовательности и/или участвуют в распознавании антигенов. За исключением CDR1 в VH, CDR обычно содержат аминокислотные остатки, образующие гипервариабельные петли. Гипервариабельные области (HVR) также называют «определяющими комплементарность областями» (CDR), и эти термины используются в данном документе взаимозаменяемо по отношению к частям вариабельной области, которые образуют антигенсвязывающие области. Эта конкретная область была описана у Kabat et al., CSHU.S. Dept, of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) и у Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987), где определения включают перекрывание или подмножества аминокислотных остатков при

сравнении друг с другом. Тем не менее предполагается, что применение любого определения для обозначения CDR антитела или его вариантов находится в пределах объема термина, определенного и используемого в данном документе. Точные номера остатков, которые охватывают конкретную CDR, будут варьироваться в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники могут обычным образом определить, какие остатки содержат конкретный CDR, учитывая аминокислотную последовательность вариабельной области антитела.

[0323] Границы аминокислотной последовательности CDR могут быть определены специалистом в данной области техники с помощью любой из ряда известных схем нумерации, включая схемы, описанные Kabat et al., выше (схема нумерации «Kabat»); Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948 (схема нумерации «Chothia»); MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol. 262:732-745 (схема нумерации «Contact»); Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol., 2003, 27:55-77 (схема нумерации «IMGT»); и Honegge and Plückthun, J. Mol. Biol., 2001, 309:657-70 (схема нумерации «АНо»); каждая из которых полностью включена посредством ссылки.

[0324] В таблице А представлены положения CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, как определено схемами Kabat и Chothia. Для CDR-H1 нумерация остатков обеспечивается с использованием схем нумерации Kabat и Chothia.

[0325] CDR могут быть присвоены, например, с использованием программного обеспечения для нумерации антител, такого как Abnum, доступного на bioinf.org.uk/abs/abnum/ и описанного в Abhinandan and Martin, Immunology, 2008, 45: 3832-3839, включенного по ссылке в полном объеме.

Таблица А. Остатки в CDR согласно схемам нумерации Kabat и Chothia.

CDR	Kabat	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97
H1 (нумерация по Kabat)	H31-H35B	H26-H32 или H34*
H1 (нумерация по Chothia)	H31-H35	H26-H32
H2	H50-H65	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102

* С-конец CDR-H1 при нумерации с использованием системы нумерации по Kabat варьируется от H32 до H34, в зависимости от длины CDR.

[0326] «Схема нумерации EU», как правило, используется для обозначения остатка в константной области тяжелой цепи антитела (например, как описано у Kabat et al., выше). Если не указано иное, схема нумерации EU используется для обозначения остатков в константных областях тяжелой цепи антитела, описанных в данном документе.

[0327] В контексте данного документа термин «одноцепочечный» относится к молекуле, содержащей аминокислотные мономеры, линейно связанные пептидными

связями. В конкретном таком варианте осуществления С-конец легкой цепи Fab соединен с N-концом тяжелой цепи Fab в одноцепочечной молекуле Fab. Как более подробно описано в данном документе, scFv имеет переменный домен легкой цепи (VL), соединенный своим С-концом с N-концом переменного домена тяжелой цепи (VH) при помощи полипептидной цепи. С другой стороны, scFv содержит полипептидную цепь, где С-терминальный конец VH соединен с N-терминальным концом VL полипептидной цепью.

[0328] «Фрагмент Fab» (также называемый как антигенсвязывающий фрагмент) содержит константный домен (CL) легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи наряду с переменными доменами VL и VH, соответственно на легкой и тяжелой цепях. Переменные домены содержат определяющую комплементарность петли (CDR, также называемую гиперпеременной областью), которые вовлечены в связывании антигена. Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab добавлением нескольких остатков на карбоксильном конце домена CH1 тяжелой цепи, в том числе одного или более цистеинов из шарнирной области антитела.

[0329] Фрагменты «F(ab')₂» содержат два фрагмента Fab' соединенных около шарнирной области дисульфидными связями. Фрагменты F(ab')₂ можно получить, например, рекомбинантными методами или ферментативным расщеплением пепсином интактного антитела. Фрагменты F(ab') можно диссоциировать, например, обработкой β-меркаптоэтанолом.

[0330] Фрагменты «Fv» содержат нековалентно связанный димер одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи.

[0331] Термины «одноцепочечные Fv» или «scFv» включают домены VH и VL антитела, причем эти домены находятся в одной полипептидной цепи. В одном варианте осуществления полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, дающий возможность scFv образовываться требуемой структуре для связывания антигена. В качестве обзора scFv см. Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). Фрагменты scFv антитела к HER2 описаны в WO93/16185; патенте США № 5571894; и патенте США. № 5587458.

[0332] Фрагменты «scFv-Fc» содержат scFv, присоединенный к домену Fc. Например, домен Fc может быть присоединен к С-концу scFv. Домен Fc может следовать за V_H или V_L, в зависимости от ориентации переменных доменов в scFv (т.е., V_H-V_L и V_L-V_H). Может быть использован любой подходящий домен Fc, известный в данной области техники или описанный в данном документе. В некоторых случаях домен Fc включает домен Fc IgG4. В некоторых случаях домен Fc включает домен Fc IgG1.

[0333] Термин «однодоменное антитело» или «sdAb» относится к молекуле, в которой один переменный домен антитела специфически связывается с антигеном без присутствия другого переменного домена. Однодоменные антитела и их фрагменты описаны в Arabi Ghahroudi et al., *FEBS Letters*, 1998, 414:521-526 и Muyldermans et al.,

Trends in Biochem. Sci., 2001, 26:230-245, каждый из которых включен в полном объеме посредством ссылки. Однодоменные антитела также известны как sdAb или наноантитела. Sdab довольно стабильны и легко экспрессируются в качестве партнера по слиянию с цепью Fc антитела (Harmsen MM, De Haard HJ (2007). «Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments». Appl. Microbiol Biotechnol. 77(1): 13-22).

[0334] Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» и «целое антитело» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения антитела, имеющего структуру, по существу аналогичную структуре природного антитела, и имеющего тяжелые цепи, которые содержат область Fc. Например, «полноразмерное антитело», когда используется для обозначения молекулы IgG, представляет собой антитело, которое содержит две тяжелые цепи и две легкие цепи.

[0335] Термин «эпитоп» означает часть антигена, которая специфически связывается с антителом. Эпитопы часто состоят из доступных на поверхности аминокислотных остатков и/или боковых цепей сахаров и могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические зарядовые характеристики. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первым, но не со вторым, может быть потеряно в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, которые непосредственно участвуют в связывании, и другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в связывании. Эпитоп, с которым связывается антитело, может быть определен с использованием известных методов определения эпитопа, таких как, например, тестирование связывания антитела с вариантами MARCO с различными точечными мутациями или с химерными MARCO. В некоторых вариантах осуществления эпитоп MARCO находится в домене SRCR. В следующих вариантах осуществления эпитоп MARCO находится в коллаген-подобном домене. В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с доменом SRCR. В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с коллаген-подобным доменом.

[0336] «Полиспецифическое антитело» представляет собой антитело, которое содержит два или более разных антигенсвязывающих домена, которые вместе специфически связывают два или более разных эпитопов. Два или более разных эпитопов могут быть эпитопами одного и того же антигена (например, одна молекула MARCO, экспрессируемая клеткой) или разных антигенов (например, разные молекулы MARCO, экспрессируемые одной и той же клеткой, или молекула MARCO и молекула, отличная от MARCO). В некоторых аспектах полиспецифическое антитело связывает два разных эпитопа (т. е. «биспецифическое антитело»). В некоторых аспектах полиспецифическое антитело связывает три разных эпитопа (т. е. «триспецифическое антитело»).

[0337] «Моноспецифическое антитело» представляет собой антитело, которое содержит один или более сайтов связывания, которые специфически связываются с одним

эпитопом. Примером моноспецифического антитела является встречающаяся в природе молекула IgG, которая, будучи двухвалентной (т. е. имеющей два антигенсвязывающих домена), распознает один и тот же эпитоп в каждом из двух антигенсвязывающих доменов. Специфичность связывания может иметь любую подходящую валентность.

[0338] Термин «моноклональное антитело» относится к антителу из популяции по существу гомогенных антител. Популяция по существу гомогенных антител включает антитела, которые по существу сходны и связывают один и тот же эпитоп(-ы), за исключением вариантов, которые обычно могут возникать во время продукции моноклонального антитела. Такие варианты, как правило, присутствуют только в незначительных количествах. Моноклональное антитело, как правило, получают с помощью процесса, который включает выбор одного антитела из множества антител. Например, процесс отбора может представлять собой отбор уникального клона из множества клонов, таких как пул гибридных клонов, фаговых клонов, дрожжевых клонов, бактериальных клонов или других клонов рекомбинантной ДНК. Выбранное антитело можно дополнительно изменить, например, для улучшения аффинности к мишени («созревание аффинности»), для гуманизации антитела, для улучшения его продукции в культуре клеток и/или для снижения его иммуногенности у субъекта.

[0339] «Эффекторные функции» относятся к тем видам биологической активности, присущей области Fc антитела, которые могут изменяться в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают связывание C1q для активации комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), связывание с Fc-рецептором для активации антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (АЗКФ), блокирование рецепторного лиганда, агонизм или антагонизм. Активная область Fc представляет собой область, которая способна выполнять основанные на Fc эффекторные функции, такие как АЗКЦ, КЗЦ и/или АЗКФ.

[0340] Антитела к MARCO могут включать описанные в данном документе, например, клоны, указанные в таблицах. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит альтернативный каркас. В некоторых вариантах осуществления антитело состоит из альтернативного каркаса. В некоторых вариантах осуществления антитело состоит по существу из альтернативного каркаса. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело состоит из фрагмента антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело состоит по существу из фрагмента антитела. «Антитело к MARCO», «антитело против MARCO» или «специфическое в отношении MARCO антитело» представляет собой антитело, представленное в данном документе, которое специфически связывается с антигеном MARCO. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с внеклеточным доменом MARCO. В определенных вариантах осуществления антитело к MARCO, представленное в данном документе, связывается с эпитопом MARCO, который является консервативным между белками MARCO разных видов или среди них.

[0341] Термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором фрагмент тяжелой и/или легкой цепи получен из конкретного источника или вида, в то время как часть тяжелой и/или легкой цепи получены из другого источника или вида.

[0342] «Гуманизированные» формы не относящихся к человеку видов антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина, не принадлежащего к человеческому роду. Гуманизированное антитело обычно представляет собой антитело человека (реципиентное антитело), в котором остатки из одной или более CDR заменены остатками из одной или более CDR нечеловеческого антитела (донорское антитело). Донорским антителом может быть любое подходящее нечеловеческое антитело, такое как мышье, крысине, кроличье, куриное или нечеловеческое антитело приматов, имеющее желаемую специфичность, аффинность или биологический эффект. Гуманизированное антитело с меньшей вероятностью будет индуцировать иммунный ответ и/или индуцирует менее тяжелый иммунный ответ по сравнению с антителом отличного от человека вида, когда его вводят субъекту-человеку. В некоторых случаях выбранные остатки каркасной области реципиентного антитела заменяются соответствующими остатками каркасной области донорского антитела. Гуманизированные антитела могут также содержать остатки, которых нет ни в антителе реципиента, ни в антителе донора. Такие модификации могут быть сделаны для дальнейшего уточнения функции антитела. Примеры получения гуманизированных антител можно найти в патенте США №№ 6054297, 5886152 и 5877293, каждый из которых полностью включен посредством ссылки. Для получения дополнительной информации, см., Jones et al, Nature, 1986, 321:522-525; Riechmann et al., Nature, 1988, 332:323-329; и Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 1992, 2:593-596, каждый из которых включен в полном объеме посредством ссылки.

[0343] В некоторых вариантах осуществления антитело включает крысине антитело к MARCO. В некоторых вариантах осуществления антитело включает химерное антитело к MARCO. В некоторых вариантах осуществления антитело включает гуманизированное антитело к MARCO. В некоторых вариантах осуществления антитело включает человеческое антитело к MARCO.

[0344] В некоторых вариантах осуществления последовательность VH гуманизированного антитела к MARCO содержит по меньшей мере одну из 16G, 19R, 23A, 37V, 42G, 48V, 49S, 82Q, 88A, 93V, 114T, 115L, S16G, K19R, V23A, I37V, K42G, I48V, A49S, E82Q, S88A, M93V, V114T, или M115L по сравнению с последовательностью VH крысы, как показано в SEQ ID NO: 141. В некоторых вариантах осуществления последовательность VH гуманизированного антитела к MARCO содержит по меньшей мере одну из G16, R19, A23, V37, G42, V48, S49, Q82, A88, V93, T114, L115, нумерация которых соответствует индексу EU. В некоторых вариантах осуществления последовательность VH гуманизированного антитела MARCO содержит по меньшей мере одну из I38, I48, A49, S54, Q54, A54, G56, S56, Q56, A56, S57, Q57 или A57, нумерация которых соответствует индексу EU.

[0345] В некоторых вариантах осуществления последовательность VL гуманизованного антитела к MARCO содержит по меньшей мере одну из 2I, 10S, 13S, 16V, 18D, 19R, 21T, 23T, 25R, 38Q, 41G, 43A, 44P, 50D, 51A, 53S, 55E, 58V, 76S, 77S, 79Q, 85T, 99Q, V2I, Y10S, A13S, P16V, E18D, S19R, S21T, S23T, K25R, E38Q, E41G, T43A, N44P, S50D, G51A, T53S, Q55E, T58V, R76S, N77S, E79Q, V85T, и S99Q по сравнению с последовательностью VL крысы, как показано в SEQ ID NO: 146. В некоторых вариантах осуществления последовательность VL гуманизованного антитела к MARCO содержит по меньшей мере одну из I2, S10, S13, V16, D18, R19, T21, T23, R25, Q38, G41, A43, P44, D50, A51, S53, E55, V58, S76, S77, Q79, T85, или Q99, нумерация которых соответствует индексу EU. В некоторых вариантах осуществления последовательность VL гуманизованного антитела к MARCO содержит по меньшей мере одну из V2, R24, K24, Q38, E38, A43, T43, N44, или P44, нумерация которых соответствует индексу EU.

[0346] В некоторых вариантах осуществления последовательность VH гуманизованного антитела к MARCO содержит по меньшей мере одну из 2V, 9A, 11V, 16A, 20V, 38R, 43Q, 46E, 62Q, 63K, 65Q, 66G, 68V, 69T, 70M, 71T, 72R, 73D, 76T, 78A, 79Y, 80M, 81E, 82L, 83S, 84S, 86R, 87S, 92V, 94Y, 96A, 114T, 115L, I2V, P9A, L11V, E16A, I20V, K38R, N43Q, K46E, D62Q, D63K, K65Q, Q66G, F68V, V69T, F70M, S71T, L72R, E73D, A76T, S78A, F79Y, L80M, Q81E, I82L, N83S, N84S, N86R, I87S, T92V, F94Y, T96A, V114T, M115L по сравнению с последовательностью VH крысы, как показано в SEQ ID NO: 231. В некоторых вариантах осуществления последовательность VH гуманизованного антитела к MARCO содержит по меньшей мере одну из V2, A9, V11, A16, V20, R38, Q43, E46, Q62, K63, Q65, G66G, V68, T69, M70, T71, R72, D73, T76, A78, Y79, M80, E81, L82, S83, S84, R86, S87, V92, Y94, A96, T114, L115, нумерация которых соответствует индексу EU.

[0347] В некоторых вариантах осуществления последовательность VL гуманизованного антитела MARCO содержит по меньшей мере одну из 9S, 15V, 17D, 18R, 20T, 22T, 24R, 40P, 43A, 45K, 70D, 72T, 73T, 76S, 77L, 82F, 84T, 86Y, 100Q, 106I, A9S, L15V, E17D, T18R, S20T, E22T, L24R, S40P, S43A, Q45K, R70D, S72T, K73T, D76S, M77L, E82F, D84T, F86Y, G100Q, L106I, по сравнению с последовательностью VL крысы, как показано в SEQ ID NO: 236. В некоторых вариантах осуществления последовательность VL гуманизованного антитела к MARCO содержит по меньшей мере одну из S9, V15, D17, R18, T20, T22, R24, P40, A43, K45, D70, T72, T73, S76, L77, F82, T84, Y86, Q100, или I106, нумерация которых соответствует индексу EU.

[0348] В некоторых вариантах осуществления последовательность VH гуманизованного антитела к MARCO содержит по меньшей мере одну из 1E, 5Q, 13K, 16E, 48I, 61P, 62S, 67V, 68T, 76N, 79S, 82L, 83S, 85V, 86T, 87A, 88A, 92V, 116T, 117L, Q1E, K5Q, Q13K, Q16E, M48I, S61P, L62S, L67V, S68T, S76N, F79S, M82L, N83S, L85V, Q86T, T87A, E88A, T92V, V116T, или M117L, по сравнению с последовательностью VH крысы, как показано в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность VH гуманизованного антитела к MARCO содержит по меньшей

мере одну из E1, Q5, K13, E16, I48, P61, S62, V67, T68, N76, S79, L82, S83, V85, T86, A87, A88, V92, T116, или L117, нумерация которых соответствует индексу EU.

[0349] В некоторых вариантах осуществления последовательность VL гуманизированного антитела MARCO содержит по меньшей мере одну из 9S, 13A, 15V, 17D, 18R, 20T, 22T, 24R, 40P, 43A, 45K, 56S, 70D, 71F, 72T, 74T, 77S, 78L, 92F, 94T, 96Y, 100Q, 9S, T13A, L15V, E17D, T18R, S20T, E22T, L24R, S40P, S43A, Q45K, D56S, R70D, Y71F, S72T, K74T, G77S, M78L, E92F, D94T, F96Y, или S100Q, по сравнению с последовательностью VL крысы, как показано в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления последовательность VL гуманизированного антитела к MARCO содержит по меньшей мере одну из S9, T13, A13, D17, R18, T20, T22, L24, R24, N31, S31, Q31, A31, D31, P40, A43, S43, I43, K45, D56, S56, D70, Y71, F71, T72, T74, S77, L78, M78, F83, E83, T85, Y87, F87, F92, T94, S100, или Q100, нумерация которых соответствует индексу EU.

[0350] В одном варианте осуществления константный домен(-ы) из антитела человека слит с переменным(-ыми) доменом(-ами) не относящегося к человеку вида. В еще одном варианте осуществления один или более аминокислотных остатков в одной или более последовательностях CDR нечеловеческого антитела изменены для снижения вероятной иммуногенности нечеловеческого антитела при его введении субъекту-человеку, причем измененные аминокислотные остатки либо не являются критическими для иммуноспецифического связывания антитела с его антигеном, либо внесенные изменения в аминокислотную последовательность являются консервативными изменениями, таким образом, чтобы связывание гуманизированного антитела с антигеном не намного хуже, чем связывание нечеловеческого антитела с антигеном.

[0351] «Антитело человека» представляет собой антитело, которое обладает аминокислотной последовательностью, соответствующей аминокислотной последовательности антитела, продуцируемого человеком или клеткой человека, или полученного из нечеловеческого источника, который использует репертуар человеческих антител или последовательности, кодирующие антитела человека (например, получены из человеческих источников или созданы *de novo*). Антитела человека конкретно исключают гуманизированные антитела. В одном варианте осуществления все переменные и константные домены получены из последовательностей человеческого иммуноглобулина (полностью человеческое антитело). Эти антитела могут быть получены различными способами, включая иммунизацию представляющим интерес антигеном мыши, которая генетически модифицирована для экспрессии антител, полученных из генов, кодирующих тяжелую и/или легкую цепь человека.

[0352] В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в данном документе, включают фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в данном документе, состоят из фрагмента антитела. В некоторых вариантах осуществления антитела, предложенные в данном документе, состоят по существу из фрагмента антитела. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fv. В некоторых вариантах

осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент F(ab')₂. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент Fab'. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент scFv (sFv). В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент scFv-Fc. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой фрагмент однодоменного антитела.

Последовательности антител к MARCO

[0353] В таблице В представлены названия и SEQ ID NO иллюстративных антител к MARCO, предложенных в данном документе.

Таблица В			SEQ ID NO:
Название	Измененное название (если необходимо)	Описание	
PI-HX-3031		исходная крысиная гибридома	1-10
PI-3010-AB	PI-3010	hIgG1/ химерное PI-HX- 3031	11-20
PI-3011-AB	PI-3010.11	гуманизированное PI-HX- 3031/3031-1 hIgG1	21-30
PI-3012-AB	PI-3010.12	гуманизированное PI-HX- 3031/3031-2 hIgG1	31-40
PI-3013-AB	PI-3010.13	гуманизированное PI-HX- 3031/3031-3 hIgG1	41-50
PI-3014-AB	PI-3010.14	гуманизированное PI-HX- 3031/3031-4 hIgG1	51-60
PI-3015-AB	PI-3010.15	гуманизированное PI-HX- 3031/3031-5 hIgG1	61-70
PI-3020-AB	PI-3010.20	химерное PI-HX- 3031 - hIgG4	71-80
PI-3022-AB	PI-3010.22	гуманизированное PI-HX- 3031/3031-2 hIgG1	81-90
PI-3023-AB	PI-3010.23	гуманизированное PI-HX- 3031/3031-2 hIgG1	91-100
PI-3024-AB	PI-3010.24	гуманизированное PI-HX- 3031/3031-2 hIgG1	101-110
PI-3025-AB	PI-3010.25	гуманизированное PI-HX- 3031/3031-2 hIgG1	434-443

PI-3026-AB	PI-3010.26	гуманизированное PI-HX- 3031/3031-2 hIgG1	121-130
PI-3027-AB	PI-3010.27	гуманизированное PI-HX- 3031/3031-2 hIgG1	131-140
PI-3046-AB	PI-3010.46	гуманизированное PI-HX- 3031/3031-2 hIgG4	474-483
PI-3048-AB	PI-3010.48	гуманизированное PI-HX- 3031/3031-2 hIgG4	444-453
PI-HX-3061		исходная крысиная гибридома	141-150
PI-3016-AB		гуманизированное PI-HX- 3061/3061-1 hIgG1	151-160
PI-3017-AB		гуманизированное PI-HX- 3061/3061-2 hIgG1	161-170
PI-3018-AB		гуманизированное PI-HX- 3061/3061-3 hIgG1	171-180
PI-3019-AB		Химерное антитело PI-HX-3061 mIgG2a	181-190
PI-3028-AB		Химерное антитело PI-HX-3061 hIgG1	191-200
PI-3029-AB		Химерное антитело PI-HX-3061 hIgG4	201-210
PI-3032-AB		гуманизированное PI-HX- 3061/3061-2 hIgG1	211-220
PI-3033-AB		гуманизированное PI-HX- 3061/3061-2 hIgG1	221-230
PI-HX-3011		исходная крысиная гибридома	231-240
PI-3030-AB	PI-3030	Химерное антитело HX3011-h1 hIgG1	241-250
PI-3036-AB	PI-3030.36	гуманизированное PI-HX- 3011/3011-1 hIgG1	311-320
PI-3037-AB	PI-3030.37	гуманизированное PI-HX- 3011/3011-2 hIgG1	321-330
PI-3038-AB	PI-3030.38	гуманизированное PI-HX- 3011/3011-3 hIgG1	331-340
PI-3039-AB	PI-3030.39	гуманизированное PI-HX- 3011/3011-4 hIgG1	341-350

PI-3040-AB	PI-3030.40	гуманизированное PI-HX- 3011/3011-5 hIgG1	351-360
PI-3041-AB	PI-3030.41	гуманизированное PI-HX- 3011/3011-5 hIgG1	454-463
PI-3047-AB	PI-3030.47	гуманизированное PI-HX- 3011/3011-5 hIgG4	464-473
PI-HX-3043		исходная крысиная гибридома	251-260
PI-3031-AB		Химерное антитело HX3043-h1 hIgG1	261-270
PI-HX-3092		исходная крысиная гибридома	361-370
PI-3035		HX3092 (мутация А) - mIgG2a	371-380

CDR

[0354] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MARCO человека (SEQ ID NO: 384), содержащие последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, при этом: CDR-H1 включает последовательность GFSLTSYHVS (SEQ ID NO: 2), CDR-H2 включает последовательность AIWTGGSIA (SEQ ID NO: 3), CDR-H3 включает последовательность DLSDYYSSYTSFDY (SEQ ID NO: 4), CDR-L1 включает последовательность ASEGISNDLA (SEQ ID NO: 431) или XASEGISNDLA (SEQ ID NO: 383), где X представляет собой аргинин (R) или лейцин (L), CDR-L2 содержит последовательность AASRLQD (SEQ ID NO: 8), и CDR-L3 включает последовательность QQSYKYPLT (SEQ ID NO: 9).

[0355] В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность LASEGISNDLA (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность RASEGISNDLA (SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность ASEGISNDLA (SEQ ID NO: 431).

[0356] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 4, CDR-H2 с SEQ ID NO: 3, CDR-H1 с SEQ ID NO: 2, CDR-L3 с SEQ ID NO: 9, CDR-L2 с SEQ ID NO: 8 и CDR-L1 с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 4, CDR-H2 с SEQ ID NO: 3, CDR-H1 с SEQ ID NO: 2, CDR-L3 с SEQ ID NO: 9, CDR-L2 с SEQ ID NO: 8 и CDR-L1 с SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе,

содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 4, CDR-H2 с SEQ ID NO: 3, CDR-H1 с SEQ ID NO: 2, CDR-L3 с SEQ ID NO: 9, CDR-L2 с SEQ ID NO: 8 и CDR-L1 с SEQ ID NO: 431. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 с SEQ ID NO: 4, CDR-H2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 с SEQ ID NO: 3, CDR-H1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1 с SEQ ID NO: 2, CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 с SEQ ID NO: 9, CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L2 с SEQ ID NO: 8 и CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 с SEQ ID NO: 431, 383, 7, или 27. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3 с SEQ ID NO: 4 с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами; CDR-H2 представляет собой CDR-H2 с SEQ ID NO: 3 с не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами; CDR-H1 представляет собой CDR-H1 с SEQ ID NO: 2 с не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами; CDR-L3 представляет собой CDR-L3 с SEQ ID NO: 9 с не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами; CDR-L2 представляет собой CDR-L2 с SEQ ID NO: 8 с не более 1, 2, 3 или 4 аминокислотными заменами; и CDR-L1 представляет собой CDR-L1 с SEQ ID NO: 431, 383, 7, или 27 с не более 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотными заменами.

[0357] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MARCO человека (SEQ ID NO: 384), содержащие последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, при этом: CDR-H1 включает последовательность GYTFTDYAVN (SEQ ID NO: 232), CDR-H2 включает последовательность WINTQTGKPT (SEQ ID NO: 233), CDR-H3 включает последовательность DSYYYSSSLDY (SEQ ID NO: 234), CDR-L1 включает последовательность ASAGISNDLA (SEQ ID NO: 432) или XASAGISNDLA (SEQ ID NO: 381), где X представляет собой лейцин (L) или аргинин (R), CDR-L2 включает последовательность AASRLQD (SEQ ID NO: 238), и CDR-L3 включает последовательность QQSYKYPWT (SEQ ID NO: 239). В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность LASAGISNDLA (SEQ ID NO: 237). В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность RASAGISNDLA (SEQ ID NO: 317). В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность ASAGISNDLA (SEQ ID NO: 432).

[0358] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 234, CDR-H2 с SEQ ID NO: 233, CDR-H1 с SEQ ID NO: 232, CDR-L3 с SEQ ID NO: 239, CDR-L2 с SEQ ID NO: 238, и CDR-L1 с SEQ ID NO: 237. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе

антитело содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 234, CDR-H2 с SEQ ID NO: 233, CDR-H1 с SEQ ID NO: 232, CDR-L3 с SEQ ID NO: 319, CDR-L2 с SEQ ID NO: 318, и CDR-L1 с SEQ ID NO: 317. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 234, CDR-H2 с SEQ ID NO: 233, CDR-H1 с SEQ ID NO: 232, CDR-L3 с SEQ ID NO: 239, CDR-L2 с SEQ ID NO: 238, и CDR-L1 с SEQ ID NO: 432. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 с SEQ ID NO: 234, CDR-H2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 с SEQ ID NO: 233, CDR-H1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1 с SEQ ID NO: 232, CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 с SEQ ID NO: 239, CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L2 с SEQ ID NO: 238, и CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 с SEQ ID NO: 432, 237, 317 или 381. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3 с SEQ ID NO: 234, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислотными заменами; CDR-H2 представляет собой CDR-H2 с SEQ ID NO: 233, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислотными заменами; CDR-H1 представляет собой CDR-H1 с SEQ ID NO: 232, с не более чем 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислотными заменами; CDR-L3 представляет собой CDR-L3 с SEQ ID NO: 239, с не более чем 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислотными заменами; CDR-L2 представляет собой CDR-L2 с SEQ ID NO: 238, с не более чем 1, 2, 3, или 4 аминокислотными заменами; и CDR-L1 представляет собой CDR-L1 с SEQ ID NO: 432, 237, 317, или 381 с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, или 6 аминокислотными заменами.

[0359] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MARCO человека (SEQ ID NO: 363), содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где: CDR-H1 включает последовательность GYTFTDYYLH (SEQ ID NO: 252), CDR-H2 включает последовательность YINPNNAYTS (SEQ ID NO: 253), CDR-H3 включает последовательность DTTDYYNLHFAY (SEQ ID NO: 254), CDR-L1 включает последовательность LTSEGISNDLA (SEQ ID NO: 257), CDR-L2 включает последовательность DASRLED (SEQ ID NO: 258), и CDR-L3 включает последовательность QQSYKYPLT (SEQ ID NO: 259).

[0360] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 254, CDR-H2 с SEQ ID NO: 253, CDR-H1 с SEQ ID NO: 252, CDR-L3 с SEQ ID NO: 259, CDR-L2 с SEQ ID NO: 258, и CDR-L1 с SEQ ID NO: 257. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 с SEQ ID NO: 254, CDR-H2

имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 с SEQ ID NO: 253, CDR-H1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1 с SEQ ID NO: 252, CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 с SEQ ID NO: 259, CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L2 с SEQ ID NO: 258, и CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 с SEQ ID NO: 257. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3 с SEQ ID NO: 254, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислотными заменами; CDR-H2 представляет собой CDR-H2 с SEQ ID NO: 253, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислотными заменами; CDR-H1 представляет собой CDR-H1 с SEQ ID NO: 252, с не более чем 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислотными заменами; CDR-L3 представляет собой CDR-L3 с SEQ ID NO: 259, с не более чем 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислотными заменами; CDR-L2 представляет собой CDR-L2 с SEQ ID NO: 258, с не более чем 1, 2, 3, или 4 аминокислотными заменами; и CDR-L1 представляет собой CDR-L1 с SEQ ID NO: 257, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотными заменами.

[0361] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MARCO человека (SEQ ID NO: 363), содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где: CDR-H1 включает последовательность KFTFSNYGMN (SEQ ID NO: 142), CDR-H2 включает последовательность LIYYNSNNKY (SEQ ID NO: 143), CDR-H3 включает последовательность SLTGGSDYFDS (SEQ ID NO: 144), CDR-L1 включает последовательность ASKISIGTFLA (SEQ ID NO: 433) или XASKISIGTFLA (SEQ ID NO: 382), где X представляет собой лизин (K) или аргинин (R), CDR-L2 включает последовательность SGSTLQS (SEQ ID NO: 148), и CDR-L3 включает последовательность QQHDEYPFT (SEQ ID NO: 149).

[0362] В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность KASKISIGTFLA (SEQ ID NO: 147). В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность RASKISIGTFLA (SEQ ID NO: 157). В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность ASKISIGTFLA (SEQ ID NO: 433).

[0363] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 144, CDR-H2 с SEQ ID NO: 143, CDR-H1 с SEQ ID NO: 142, CDR-L3 с SEQ ID NO: 149, CDR-L2 с SEQ ID NO: 148, и CDR-L1 с SEQ ID NO: 147. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 144, CDR-H2 с SEQ ID NO: 143, CDR-H1 с SEQ ID NO: 142, CDR-L3 с SEQ ID NO: 149, CDR-L2 с SEQ ID NO: 148, и CDR-L1 с SEQ ID

NO: 157. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 144, CDR-H2 с SEQ ID NO: 143, CDR-H1 с SEQ ID NO: 142, CDR-L3 с SEQ ID NO: 149, CDR-L2 с SEQ ID NO: 148, и CDR-L1 с SEQ ID NO: 433. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 с SEQ ID NO: 144, CDR-H2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 с SEQ ID NO: 143, CDR-H1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1 с SEQ ID NO: 142, CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 с SEQ ID NO: 149, CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L2 с SEQ ID NO: 148, и CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 с SEQ ID NO: 433, 382, 147 или 157. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3 с SEQ ID NO: 144, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислотными заменами; CDR-H2 представляет собой CDR-H2 с SEQ ID NO: 143, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислотными заменами; CDR-H1 представляет собой CDR-H1 с SEQ ID NO: 142, с не более чем 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислотными заменами; CDR-L3 представляет собой CDR-L3 с SEQ ID NO: 149, с не более чем 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислотными заменами; CDR-L2 представляет собой CDR-L2 с SEQ ID NO: 148, с не более чем 1, 2, 3, или 4 аминокислотными заменами; и CDR-L1 представляет собой CDR-L1 с SEQ ID NO: 433, 382, 147, или 157 с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, или 6 аминокислотными заменами.

[0364] В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MARCO человека (SEQ ID NO: 384), содержащие последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где: CDR-H1 включает последовательность GFSLTSYTLS (SEQ ID NO: 362), CDR-H2 включает последовательность AIWGGDNTD (SEQ ID NO: 363), CDR-H3 включает последовательность ELGGSFDY (SEQ ID NO: 364), CDR-L1 включает последовательность KTSQNINKKLD (SEQ ID NO: 367), CDR-L2 включает последовательность YTNNLQT (SEQ ID NO: 368), и CDR-L3 включает последовательность YQYDSGFT (SEQ ID NO: 369).

[0365] В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 с SEQ ID NO: 364, CDR-H2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 с SEQ ID NO: 363, CDR-H1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1 с SEQ ID NO: 362, CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 с SEQ ID NO: 369, CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с

CDR-L2 с SEQ ID NO: 368, и CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 с SEQ ID NO: 367. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3 с SEQ ID NO: 364, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами; CDR-H2 представляет собой CDR-H2 SEQ ID NO: 363, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислотными заменами; CDR-H1 представляет собой CDR-H1 с SEQ ID NO: 362, с не более чем 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислотными заменами; CDR-L3 представляет собой CDR-L3 с SEQ ID NO: 369, с не более чем 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислотными заменами; CDR-L2 представляет собой CDR-L2 с SEQ ID NO: 368, с не более чем 1, 2, 3, или 4 аминокислотными заменами; и CDR-L1 представляет собой CDR-L1 с SEQ ID NO: 367 с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, или 6 аминокислотными заменами.

[0366] В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, упоминаются в данном документе как «варианты». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого метода, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, предложенной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, предложенным в данном документе, для получения антител.

[0367] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит CDR-H3, выбранную из SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194, 204, 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 437, 447, 457, 467, или 477. В некоторых аспектах CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 с SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194, 204, 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 437, 447, 457, 467, или 477. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3, выбранную из SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194, 204, 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 437, 447, 457, 467, или 477, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены.

[0368] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит CDR-H2 с SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 153, 163, 173, 183, 193, 203, 213, 223, 233, 243, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 376, 436, 446, 456, 466, или 476. В некоторых аспектах CDR-

H2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H2 с SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 513, 163, 173, 183, 193, 203, 213, 223, 233, 243, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 376, 436, 446, 456, 466, или 476. В некоторых вариантах осуществления CDR-H2 представляет собой CDR-H2 с SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 513, 163, 173, 183, 193, 203, 213, 223, 233, 243, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 376, 436, 446, 456, 466, или 476, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены.

[0369] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит CDR-H1 с SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 435, 445, 455, 465, или 475. В некоторых аспектах CDR-H1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H1 с SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 435, 445, 455, 465, или 475. В некоторых вариантах осуществления CDR-H1 представляет собой CDR-H1 с SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 435, 445, 455, 465 или 475, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены.

[0370] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит CDR-H3 с SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194, 204, 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 437, 447, 457, 467, или 477, CDR-H2 с SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 513, 163, 173, 183, 193, 203, 213, 223, 233, 243, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 376, 436, 446, 456, 466, или 476, и CDR-H1 с SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 435, 445, 455, 465, или 475. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-H3 с SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194, 204, 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 437, 447, 457, 467, или 477, CDR-H2 имеет по меньшей мере 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, или 95% идентичности с CDR-H2 с SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 513, 163, 173, 183, 193, 203, 213, 223, 233, 243, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 376, 436, 446, 456, 466, или 476, и CDR-H1 имеет по меньшей мере 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, или 95% идентичности с CDR-H1 с SEQ ID NO: 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182,

192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 435, 445, 455, 465, или 475. В некоторых CDR-H3 представляет собой CDR-H3 с SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, 54, 64, 74, 84, 94, 104, 114, 124, 134, 144, 154, 164, 174, 184, 194, 204, 214, 224, 234, 244, 254, 264, 274, 284, 294, 304, 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, 437, 447, 457, 467, или 477, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислотными заменами; CDR-H2 представляет собой CDR-H2 с SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 153, 163, 173, 183, 193, 203, 213, 223, 233, 243, 253, 263, 273, 283, 293, 303, 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, 376, 436, 446, 456, 466, или 476, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислотными заменами; и CDR-H1 представляет собой CDR-H1 с SEQ ID NO: : 2, 12, 22, 32, 42, 52, 62, 72, 82, 92, 102, 112, 122, 132, 142, 152, 162, 172, 182, 192, 202, 212, 222, 232, 242, 252, 262, 272, 282, 292, 302, 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, 435, 445, 455, 465, или 475, с не более чем 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены.

[0371] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит CDR-L3 с SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219, 229, 239, 249, 259, 269, 279, 289, 299, 309, 319, 329, 339, 349, 359, 369, 379, 442, 452, 462, 472, или 482. В некоторых аспектах CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 с SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219, 229, 239, 249, 259, 269, 279, 289, 299, 309, 319, 329, 339, 349, 359, 369, 379, 442, 452, 462, 472, или 482. В некоторых вариантах осуществления CDR-L3 представляет собой CDR-L3 с SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219, 229, 239, 249, 259, 269, 279, 289, 299, 309, 319, 329, 339, 349, 359, 369, 379, 442, 452, 462, 472, или 482, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены.

[0372] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит CDR-L2 с SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 218, 228, 238, 248, 258, 268, 278, 288, 298, 308, 318, 328, 338, 348, 358, 368, 378, 441, 451, 461, 471, или 481. В некоторых аспектах CDR-L2 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L2 с SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 218, 228, 238, 248, 258, 268, 278, 288, 298, 308, 318, 328, 338, 348, 358, 368, 378, 441, 451, 461, 471, или 481. В некоторых вариантах осуществления CDR-L2 представляет собой CDR-L2 с SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 218, 228, 238, 248, 258, 268, 278, 288, 298, 308, 318, 328, 338, 348, 358, 368, 378, 441, 451, 461, 471, или 481, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены.

[0373] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит CDR-L1 с SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127,

137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 381, 382, 383, 440, 450, 460, 470, или 480. В некоторых аспектах CDR-L1 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L1 с SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 381, 382, или 383, 440, 450, 460, 470, или 480. В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 представляет собой CDR-L1 с SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 381, 382, 383, 440, 450, 460, 470, или 480, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислотными заменами.

[0374] В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит CDR-L3 с SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219, 229, 239, 249, 259, 269, 279, 289, 299, 309, 319, 329, 339, 349, 359, 369, 379, 442, 452, 462, 472, или 482, и CDR-L2 с SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 218, 228, 238, 248, 258, 268, 278, 288, 298, 308, 318, 328, 338, 348, 358, 368, 378, 441, 451, 461, 471, или 481. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит CDR-L3 с SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219, 229, 239, 249, 259, 269, 279, 289, 299, 309, 319, 329, 339, 349, 359, 369, 379, 442, 452, 462, 472 или 482, CDR-L2 с SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 218, 228, 238, 248, 258, 268, 278, 288, 298, 308, 318, 328, 338, 348, 358, 368, 378, 441, 451, 461, 471 или 481, и CDR-L1 с SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 381, 382, или 383, 440, 450, 460, 470, или 480. В некоторых вариантах осуществления CDR-L3 имеет по меньшей мере около 50%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичности с CDR-L3 с SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219, 229, 239, 249, 259, 269, 279, 289, 299, 309, 319, 329, 339, 349, 359, 369, 379, 442, 452, 462, 472, или 482, CDR-L2 имеет по меньшей мере 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, или 95% идентичности с CDR-L2 с SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78, 88, 98, 108, 218, 228, 238, 248, 258, 268, 278, 288, 298, 308, 318, 328, 338, 348, 358, 368, 378, 441, 451, 461, 471, или 481, и CDR-L1 имеет по меньшей мере 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, или 95% идентичности с CDR-L1 с SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 381, 382, 383, 440, 450, 460, 470, или 480. В некоторых вариантах осуществления CDR-L3 представляет собой CDR-L3 с SEQ ID NO: 9, 19, 29, 39, 49, 59, 69, 79, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 159, 169, 179, 189, 199, 209, 219, 229, 239, 249, 259, 269, 279, 289, 299, 309, 319, 329, 339, 349, 359, 369, 379, 442, 452, 462, 472, или 482, с не более чем 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислотными заменами; CDR-L2 представляет собой CDR-L2 с SEQ ID NO: 8, 18, 28, 38, 48, 58, 68, 78,

88, 98, 108, 218, 228, 238, 248, 258, 268, 278, 288, 298, 308, 318, 328, 338, 348, 358, 368, 378, 441, 451, 461, 471, или 481, с не более чем 1, 2, 3, или 4 аминокислотными заменами; и CDR-L1 представляет собой CDR-L1 с SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 157, 167, 177, 187, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, 381, 382, 383, 440, 450, 460, 470, или 480, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, или 6 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены.

[0375] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит от одной до трех CDR домена V_H, выбранного из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 434, 444, 454, 464, или 474. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит от двух до трех CDR домена V_H, выбранного из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 434, 444, 454, 464, или 474. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе содержит три CDR домена V_H, выбранного из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 434, 444, 454, 464, или 474. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Kabat. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Chothia. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно AbM. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Contact. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно IMGT.

[0376] В некоторых вариантах осуществления CDR-H1 представляет собой CDR-H1 домена V_H, выбранного из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 434, 444, 454, 464, или 474, с не более чем 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления CDR-H2 представляет собой CDR-H2 домена V_H, выбранного из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 434, 444, 454, 464, или 474, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления CDR-H3 представляет собой CDR-H3 домена V_H, выбранного из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 434, 444, 454, 464, или 474, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в данном абзаце, называются «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе,

например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого метода, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, предложенной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, предложенным в данном документе, для получения антител.

[0377] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит от одной до трех CDR домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 434, 444, 454, 464, или 474. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе содержит от двух до трех CDR домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 434, 444, 454, 464, или 474. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе содержит три CDR домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 434, 444, 454, 464, или 474. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Kabat. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Chothia. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно AbM. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Contact. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно IMGT.

[0378] В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 представляет собой CDR-L1 домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 434, 444, 454, 464, или 474, с не более чем 1, 2, 3, 4, или 5 аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления CDR-L2 представляет собой CDR-L2 домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, или 376, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислотными заменами. В некоторых вариантах осуществления CDR-L3 представляет собой CDR-L3 домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 434, 444, 454, 464, или 474, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в данном абзаце, называются «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого

метода, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, предложенной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, предложенным в данном документе, для получения антител.

[0379] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит от одной до трех CDR домена VH, выбранного из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 434, 444, 454, 464, или 474, и от одного до трех CDR домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 434, 444, 454, 464, или 474. В некоторых вариантах осуществления, предложенное в данном документе антитело содержит от двух до трех CDR домена VH, выбранного из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 434, 444, 454, 464 или 474, и от двух до трех CDR домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 434, 444, 454, 464, или 474. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе содержит три CDR домена VH, выбранного из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 434, 444, 454, 464, или 474, и три CDR домена VL, выбранного из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 434, 444, 454, 464, или 474. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Kabat. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Chothia. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно AbM. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно Contact. В некоторых аспектах CDR представляют собой CDR согласно IMGT.

Домены V_H

[0380] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат последовательность V_H, выбранную из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 434, 444, 454, 464, или 474. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе,

мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, или 99% идентичности с SEQ ID NO: 221. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит последовательность V_H , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, или 99% идентичности с SEQ ID NO: 241. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит последовательность V_H , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, или 99% идентичности с SEQ ID NO: 261. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит последовательность V_H , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, или 99% идентичности с SEQ ID NO: 351. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит последовательность V_H , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, или 99% идентичности с SEQ ID NO: 371. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит последовательность V_H , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, или 99% идентичности с SEQ ID NO: 434. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит последовательность V_H , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, или 99% идентичности с SEQ ID NO: 444. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит последовательность V_H , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, или 99% идентичности с SEQ ID NO: 454. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит последовательность V_H , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, или 99% идентичности с SEQ ID NO: 464. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит последовательность V_H , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, или 99% идентичности с SEQ ID NO: 474.

[0383] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит последовательность V_H , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичности с иллюстративной последовательностью V_H , представленной в SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 434, 444, 454, 464, или 474. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит последовательность V_H , представленную в SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 434, 444, 454, 464, или 474, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, или 25 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в данном абзаце, называются «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе,

например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого метода, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, предложенной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, предложенным в данном документе, для получения антител.

[0384] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, кодируются полинуклеотидной последовательностью, приведенной в любой из SEQ ID NO: 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, или 426.

Домены V_L

[0385] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат последовательность V_L, выбранную из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 439, 449, 459, 469, или 479. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_L SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_L SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_L SEQ ID NO: 126. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_L SEQ ID NO: 186. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_L SEQ ID NO: 196. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_L SEQ ID NO: 226. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_L SEQ ID NO: 246. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_L SEQ ID NO: 266. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_L SEQ ID NO: 356. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_L SEQ ID NO: 376.

[0386] В некоторых вариантах осуществления последовательность V_L имеет по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичности с SEQ ID NO: 6, при этом любое изменение SEQ ID NO: 6 не происходит в пределах CDR-L1, CDR-L2, или CDR-L3. В некоторых вариантах осуществления последовательность V_L имеет по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичности с SEQ ID NO: 26, при этом любое изменение SEQ ID NO: 26 не происходит в пределах CDR-L1, CDR-L2, или CDR-L3. В некоторых вариантах

содержит последовательность V_L , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичности с последовательностью V_L с SEQ ID NO: 479.

[0388] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит последовательность V_L , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичности с иллюстративной последовательностью V_L , представленной в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 439, 449, 459, 469, или 479. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит последовательность V_L , представленную в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 439, 449, 459, 469, или 479, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, или 25 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в данном абзаце, называются «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого метода, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, предложенной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, предложенным в данном документе, для получения антител.

Комбинации V_H - V_L

[0389] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленные в данном документе, содержат последовательность V_H , выбранную из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 434, 444, 454, 464, или 474; и последовательность V_L , выбранную из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 439, 449, 459, 469, или 479.

[0390] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 1 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 21 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 121 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 126. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 181 и

последовательность V_L с SEQ ID NO: 186. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 191 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 196. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 221 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 226. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 241 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 246. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 261 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 266. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H с SEQ ID NO: 351 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 356. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 371 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 376. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 434 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 439. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 444 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 449. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 454 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 459. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 464 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 469. В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, содержит последовательность V_H SEQ ID NO: 474 и последовательность V_L с SEQ ID NO: 479.

[0391] В некоторых вариантах осуществления последовательность V_H имеет по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичности с SEQ ID NO: 1, и при этом вариабельная область легкой цепи имеет по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичности с SEQ. ID NO: 6, при этом любое изменение SEQ ID NO: 1 не происходит в пределах CDR-H1, CDR-H2 или CDR-H3 и при этом любое изменение SEQ ID NO: 6 не происходит в пределах CDR-L1, CDR-L2 или CDR-L3. В некоторых вариантах осуществления последовательность V_H имеет по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичности с SEQ ID NO: 21, и при этом вариабельная область легкой цепи имеет по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичности с SEQ ID NO: 26, при этом любое изменение SEQ ID NO: 21 не происходит в пределах CDR-H1, CDR-H2 или CDR-H3, и при этом любое изменение SEQ ID NO: 26 не происходит в пределах CDR-L1, CDR-L2, или CDR-L3. В некоторых вариантах осуществления последовательность V_H имеет по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичности с SEQ ID NO: 121, и при этом вариабельная область легкой цепи имеет по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичности с SEQ ID NO: 126, при этом любое изменение SEQ ID NO: 121 не происходит в пределах CDR-H1, CDR-H2 или CDR-H3, и

вариантах осуществления последовательность V_H имеет по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичности с SEQ ID NO: 434, и при этом вариабельная область легкой цепи имеет по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичности с SEQ ID NO: 439, при этом любое изменение SEQ ID NO: 434 не происходит в пределах CDR-H1, CDR-H2 или CDR-H3, и при этом любое изменение SEQ ID NO: 439 не происходит в пределах CDR-L1, CDR-L2, или CDR-L3. В некоторых вариантах осуществления последовательность V_H имеет по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичности с SEQ ID NO: 444, и при этом вариабельная область легкой цепи имеет по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичности с SEQ ID NO: 449, при этом любое изменение SEQ ID NO: 444 не происходит в пределах CDR-H1, CDR-H2 или CDR-H3, и при этом любое изменение SEQ ID NO: 449 не происходит в пределах CDR-L1, CDR-L2, или CDR-L3. В некоторых вариантах осуществления последовательность V_H имеет по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичности с SEQ ID NO: 454, и при этом вариабельная область легкой цепи имеет по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичности с SEQ ID NO: 459, при этом любое изменение SEQ ID NO: 454 не происходит в пределах CDR-H1, CDR-H2 или CDR-H3, и при этом любое изменение SEQ ID NO: 459 не происходит в пределах CDR-L1, CDR-L2, или CDR-L3. В некоторых вариантах осуществления последовательность V_H имеет по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичности с SEQ ID NO: 464, и при этом вариабельная область легкой цепи имеет по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичности с SEQ ID NO: 469, при этом любое изменение SEQ ID NO: 464 не происходит в пределах CDR-H1, CDR-H2 или CDR-H3, и при этом любое изменение SEQ ID NO: 469 не происходит в пределах CDR-L1, CDR-L2, или CDR-L3. В некоторых вариантах осуществления последовательность V_H имеет по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичности с SEQ ID NO: 474, и при этом вариабельная область легкой цепи имеет по меньшей мере 70%, 80% или 90% идентичности с SEQ ID NO: 479, при этом любое изменение SEQ ID NO: 474 не происходит в пределах CDR-H1, CDR-H2 или CDR-H3, и при этом любое изменение SEQ ID NO: 479 не происходит в пределах CDR-L1, CDR-L2, или CDR-L3.

[0392] В некоторых аспектах любую из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 434, 444, 454, 464, или 474 можно комбинировать с любой из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 439, 449, 459, 469, или 479. Например, SEQ ID NO: 11 можно комбинировать с любой из SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 439, 449, 459, 469, или 479. В качестве другого примера, SEQ ID NO: 16 можно комбинировать с любой из SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 434, 444, 454, 464, или 474.

[0393] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит последовательность V_H , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичности с иллюстративной последовательностью V_H , представленной в SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, или 371; и последовательность V_L , имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичности с иллюстративной последовательностью V_L , представленной в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 439, 449, 459, 469, или 479. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит последовательность V_H , представленную в SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211, 221, 231, 241, 251, 261, 271, 281, 291, 301, 311, 321, 331, 341, 351, 361, 371, 434, 444, 454, 464, или 474 с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислотными заменами, и последовательность V_L , представленную в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216, 226, 236, 246, 256, 266, 276, 286, 296, 306, 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, 439, 449, 459, 469, или 479, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, или 25 аминокислотными заменами. В некоторых аспектах аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в данном абзаце, называются «вариантами». В некоторых вариантах осуществления такие варианты получены из последовательности, предложенной в данном документе, например, путем созревания аффинности, сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или любого другого метода, известного в данной области техники или описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления такие варианты не являются производными от последовательности, предложенной в данном документе, и могут, например, быть выделены *de novo* согласно способам, предложенным в данном документе, для получения антител.

[0394] В некоторых вариантах осуществления процент гомологии вариабельной области тяжелой или вариабельной области легкой цепи рассчитывают вне CDR. Например, можно рассчитать процент гомологии в каркасных областях

[0395] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145, 155, 165, 175, 185, 195, 205, 215, 225, 235, 245, 255, 265, 275, 285, 295, 305, 315, 325, 335, 345, 355, 365, 375, 438, 448, 458, 468 или 478.

[0396] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 210, 220, 230,

240, 250, 260, 270, 280, 290, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 443, 453, 463, 473, или 483.

[0397] В определенных аспектах любую из SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145, 155, 165, 175, 185, 195, 205, 215, 225, 235, 245, 255, 265, 275, 285, 295, 305, 315, 325, 335, 345, 355, 365, 375, 438, 448, 458, 468 или 478 можно комбинировать с любой из SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 443, 453, 463, 473, или 483.

[0398] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, или 99% идентичности с иллюстративной последовательностью V_H , представленной в SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145, 155, 165, 175, 185, 195, 205, 215, 225, 235, 245, 255, 265, 275, 285, 295, 305, 315, 325, 335, 345, 355, 365, 375, 438, 448, 458, 468 или 478; и последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичности с иллюстративной последовательностью V_L , представленной в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 443, 453, 463, 473, или 483. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит последовательность тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 135, 145, 155, 165, 175, 185, 195, 205, 215, 225, 235, 245, 255, 265, 275, 285, 295, 305, 315, 325, 335, 345, 355, 365, 375, 438, 448, 458, 468 или 478 с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, или 25 аминокислотными заменами, и последовательность легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 443, 453, 463, 473, или 483, с не более чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, или 25 аминокислотными заменами.

[0399] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотидная последовательность антитела или антигенсвязывающего фрагмента содержат сигнальную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 427 или 430. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность антитела или антигенсвязывающего фрагмента содержат сигнальную последовательность, как показано в SEQ ID NO: 428 или 429.

Область Fc

[0400] Термин «домен Fc» или «область Fc» в данном документе используется для определения C-терминальной области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Данный термин включает нативные последовательности областей Fc и варианты областей Fc. Если не указано иное, нумерация аминокислотных остатков области Fc или константной области соответствует

системе нумерации EU, также называемой индексом EU, как описано в Kabat et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. В контексте данного документа «полипептид Fc» димерного Fc относится к одному из двух полипептидов, образующих димерный домен Fc, т.е. полипептид, содержащий С-терминальные константные области тяжелой цепи иммуноглобулина, который способен к стабильной самоассоциации. Например, полипептид Fc димерного Fc IgG содержит последовательность константных доменов CH2 IgG и CH3 IgG. Fc может относиться к классу IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, и IgA₂.

[0401] Термины «рецептор Fc» и «FcR» используются для описания рецептора, который связывается с областью Fc антитела. Например, FcR может представлять собой FcR с нативной человеческой последовательностью. В целом FcR представляет собой рецептор, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII, и FcγRIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. Рецепторы FcγRII включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые содержат аналогичные аминокислотные последовательности, отличающиеся преимущественно цитоплазматическими доменами. С определенными FcR также могут связываться иммуноглобулины других изотипов (см., например, Janeway et al., *Immuno Biology: the immune system in health and disease*, (Elsevier Science Ltd., NY) (4th ed., 1999)). Активирующий рецептор FcγRIIA содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит мотив ингибирования на основе тирозина иммунорецептора (ITIM) в своем цитоплазматическом домене (см., обзор M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcR рассмотрены в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Другие FcR, включая те, которые будут идентифицированы в будущем, включены в термин «FcR» в данном документе. Этот термин также включает неонатальный рецептор, FcRn, отвечающий за перенос материнских IgG в плод (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976); и Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

[0402] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG1.

[0403] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG3.

[0404] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG2.

[0405] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG4.

[0406] Модификации в домене CH2 могут влиять на связывание FcR с Fc. В данной области техники известен ряд аминокислотных модификаций в области Fc для селективного изменения аффинности Fc к различным рецепторам к Fc-гамма (Fc γ). В одном варианте осуществления Fc содержит одну или более модификаций, способствующих селективному связыванию Fc-гамма-рецепторов.

[0407] В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе антитело содержит модификации для улучшения его способности опосредовать эффекторную функцию. Такие модификации известны в данной области техники и включают афукозилирование или конструирование аффинности Fc в направлении активации рецептора, в основном FCGR3a, в отношении АЗКЦ, и в направлении C1q в отношении КЗЦ.

[0408] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит область Fc с одной или более аминокислотными заменами, которые улучшают АЗКЦ.

[0409] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит одно или более изменений, которые улучшают или уменьшают связывание C1q и/или КЗЦ. См. патент США № 6194551; WO 99/51642; и Idusogie et al., *J. Immunol.*, 2000, 164:4178-4184; каждый из которых включен посредством ссылки во всей полноте.

[0410] Таким образом, в одном варианте осуществления антитело, описанное в данном документе, может включать димерный Fc, содержащий одну или более аминокислотных модификаций, которые обеспечивают улучшенную эффекторную функцию. В еще одном варианте осуществления антител может быть афукозилировано для улучшения эффекторной функции.

[0411] Модификации Fc, снижающие связывание Fc γ R и/или комплемента, и/или эффекторную функцию, известны в данной области техники. В недавних публикациях описаны стратегии, которые использовались для создания антител со сниженной или подавленной эффекторной активностью (см. Strohl, WR (2009), *Curr Opin Biotech* 20:685-691, и Strohl, WR and Strohl LM, "Antibody Fc engineering for optimal antibody performance" In *Therapeutic Antibody Engineering*, Cambridge: Woodhead Publishing (2012), pp 225-249). Эти стратегии включают снижение эффекторной функции путем модификации гликозилирования, используя каркасы IgG2/IgG4 или введение мутаций в шарнирную или CH2 области Fc. Например, в публикации патента США № 2011/0212087 (Strohl), публикации международного патента № WO 2006/105338 (Xencor), публикации патента США № 2012/0225058 (Xencor), публикации патента США № 2012/0251531 (Genentech), и Strop et al ((2012) *J. Mol. Biol.* 420: 204-219) описаны специфические модификации для уменьшения связывания Fc γ R или комплемента с Fc.

[0412] Способы получения антител с незначительным содержанием фукозы или без нее на сайте гликозилирования Fc (Asn 297, нумерация EU) без изменения аминокислотной последовательности хорошо известны в данной области техники.

Технология GlymaX® (ProBioGen AG) основана на введении гена фермента, который изменяет клеточный путь биосинтеза фукозы, в клетки, используемые для получения антител. Это предотвращает добавление сахарной «фукозы» к углеводной части N-связанного антитела со стороны продуцирующих антитела клеток. (von Horsten et al. (2010) *Glycobiology*. 2010 Dec; 20 (12):1607-18). Иллюстративные линии клеток, способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают CHO-DG44 со стабильной сверхэкспрессией бактериальной оксидоредуктазы GDP-6-дезоксид-ликсо-4-гексилоредуктазы (RMD) (см. Henning von Horsten et al., *Glycobiol* 2010, 20:1607-1618) или клетки Lec13 CHO, у которых отсутствует фукозилирование белка (см. Ripka et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 1986, 249:533-545; публикацию патента США № 2003/0157108; WO 2004/056312; каждая из которых полностью включена посредством ссылки), и линии клеток с нокаутом, такой как ген альфа-1,6-фукозилтрансферазы, или клетки CHO с нокаутом FUT8 (см. Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.*, 2004, 87: 614-622; Kanda et al., *Biotechnol. Bioeng.* 2006, 94:680-688; и WO 2003/085107; каждая из которых полностью включена посредством ссылки). Другой подход к получению антител с пониженным уровнем фукозилирования можно найти в патенте США 8409572, который обеспечивает информацию относительно отбора линии клеток для получения антител по их способности обеспечивать более низкие уровни фукозилирования антител.

[0413] Иллюстративные линии клеток, способных продуцировать дефукозилированное антитело, включают CHO-DG44 со стабильной сверхэкспрессией бактериальной оксидоредуктазы GDP-6-дезоксид-ликсо-4-гексилоредуктазы (RMD) (см. Henning von Horsten et al., *Glycobiol* 2010, 20:1607-1618) или клетки Lec13 CHO, у которых отсутствует фукозилирование белка (см. Ripka et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 1986, 249:533-545; публикацию патента США № 2003/0157108; WO 2004/056312; каждая из которых полностью включена посредством ссылки), и линии клеток с нокаутом, такой как ген альфа-1,6-фукозилтрансферазы, или клетки CHO с нокаутом FUT8 (см. Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.*, 2004, 87: 614-622; Kanda et al., *Biotechnol. Bioeng.* 2006, 94:680-688; и WO 2003/085107; каждая из которых полностью включена посредством ссылки).

[0414] Антитела могут быть полностью афукозилированными (что означает, что они не содержат обнаруживаемой фукозы) или они могут быть частично афукозилированными, что означает, что выделенное антитело содержит менее 95%, менее 85%, менее 75%, менее 65%, менее 55%, менее 45%, менее 35%, менее 25%, менее 15% или менее 5% от количества фукозы, обычно обнаруживаемого для аналогичного антитела, продуцируемого с помощью системы экспрессии млекопитающих.

[0415] В некоторых аспектах предлагаемое в данном документе антитело содержит домен IgG1 с пониженным содержанием фукозы в положении Asn 297 по сравнению с природным доменом IgG1. Известно, что такие домены Fc улучшают АЗКЦ. См. Shields et al., *J. Biol. Chem.*, 2002, 277:26733-26740, включенную посредством ссылки в полном объеме. В некоторых аспектах такие антитела не содержат фукозу в положении Asn 297.

Количество фукозы можно определить с использованием любого подходящего способа, например, как описано в WO 2008/077546, включенной посредством ссылки во всей ее полноте.

[0416] В некоторых вариантах осуществления антитело, предложенное в данном документе, включает половинный олигосахарид, такой как двухантенный олигосахарид, присоединенный к области Fc антитела, которая разделена пополам GlcNAc. Такие варианты антител могут иметь пониженное фукозилирование и/или улучшенную функцию АЗКЦ. Примеры таких вариантов антител описаны, например, в WO 2003/011878; патенте США № 6602684; и публикации патента США № 2005/0123546; каждый из которых полностью включен посредством ссылки.

[0417] Другие иллюстративные варианты гликозилирования, которые могут быть включены в антитела, представленные в данном документе, описаны, например, в патентных публикациях США №№ 2003/0157108, 2004/0093621, 2003/0157108, 2003/0115614, 2002/0164328, 2004/0093621, 2004/0132140, 2004/0110704, 2004/0110282, 2004/0109865; международных патентных публикациях № 2000/61739, 2001/29246, 2003/085119, 2003/084570, 2005/035586, 2005/035778; 2005/053742, 2002/031140; Okazaki et al., *J. Mol. Biol.*, 2004, 336:1239-1249; и Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.*, 2004, 87: 614-622; каждая из которых включена в полном объеме посредством ссылки.

[0418] В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, содержит область Fc с по меньшей мере одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенным к области Fc. Такие варианты антител могут иметь улучшенную функцию КЗЦ. Примеры таких вариантов антител описаны, например, в WO 1997/30087; WO 1998/58964; и WO 1999/22764; каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте.

[0419] Иллюстративные линии клеток, способных продуцировать дефукозилированные антитела, включают CHO-DG44 со стабильной сверхэкспрессией бактериальной оксидоредуктазы GDP-6-дезоксид-ликсо-4-гексилоредуктазы (RMD) (см. Henning von Horsten et al., *Glycobiol* 2010, 20:1607-1618) или клетки Lec13 CHO, у которых отсутствует фукозилирование белка (см. Ripka et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986, 249:533-545; публикацию патента США № 2003/0157108; WO 2004/056312; каждая из которых полностью включена посредством ссылки), и линии клеток с нокаутом, такой как ген альфа-1,6-фукозилтрансферазы, или клетки CHO с нокаутом FUT8 (см. Yamane-Ohnuki et al., *Biotech. Bioeng.*, 2004, 87: 614-622; Kanda et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 94:680-688; и WO 2003/085107; каждая из которых полностью включена посредством ссылки).

[0420] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность антителозависимого клеточноопосредованного фагоцитоза (АЗКФ). АЗКФ может возникать, когда антитела связываются с антигенами на поверхности патогенных или онкогенных клеток-мишеней. Фагоцитарные клетки, несущие Fc-рецепторы на своей клеточной поверхности, включая моноциты и макрофаги, распознают и связывают

область Fc антител, связанных с клетками-мишенями. После связывания Fc-рецептора с клеткой-мишенью, связанной с антителом, может начаться фагоцитоз клетки-мишени. АЗКФ можно рассматривать как форму АЗКЦ.

[0421] В некоторых вариантах осуществления антитела способны образовывать иммунный комплекс. Например, иммунный комплекс может быть опухолевой клеткой, покрытой антителами.

[0422] В некоторых аспектах антитело к MARCO по существу не связывается с миелоидными клетками, присутствующими вне раковой ткани. В некоторых аспектах антитело к MARCO по существу не связывает стимулирующие миелоидные клетки, присутствующие в раковой ткани.

[0423] В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой моноклональные антитела.

[0424] В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой поликлональные антитела.

[0425] В некоторых вариантах осуществления антитела продуцируются гибридомами. В других вариантах осуществления антитела продуцируются рекомбинантными клетками, сконструированными для экспрессии желаемых переменных и константных доменов.

[0426] В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть одноцепочечными антителами или другими производными антител, сохраняющими антигенную специфичность и нижнюю шарнирную область или ее вариант.

[0427] В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть полифункциональными антителами, рекомбинантными антителами, человеческими антителами, гуманизированными антителами, их фрагментами или вариантами. В конкретных вариантах осуществления фрагмент антитела или его производное выбрано из фрагмента Fab, фрагмента Fab'2, CDR и ScFv.

[0428] В некоторых вариантах осуществления антитела являются специфичными в отношении поверхностных антигенов, таких как белок MARCO. В некоторых вариантах осуществления терапевтические антитела специфичны в отношении опухолевых антигенов (например, молекул, специфически экспрессируемых опухолевыми клетками). В конкретных вариантах осуществления терапевтические антитела могут иметь части Fc IgG1 или IgG3 человека или отличного от человека примата.

Связывание

[0429] Что касается связывания антитела с молекулой-мишенью, термины «связывает», «специфическое связывание», «специфически связывается с», «специфично для», «селективно связывается» и «селективно в отношении» конкретного антигена (например, полипептид-мишень) или эпитоп на конкретном антигене означает связывание, которое заметно отличается от неспецифического или неселективного взаимодействия (например, с молекулой, не являющейся мишенью). Специфическое связывание можно измерить, например, путем измерения связывания с молекулой-

мишенью и сравнения его со связыванием с молекулой, отличной от мишени. Специфическое связывание также может быть определено путем конкуренции с контрольной молекулой, которая имитирует эпитоп, распознаваемый на молекуле-мишени. В этом случае специфическое связывание указывается, если связывание антитела с молекулой-мишенью конкурентно ингибируется контрольной молекулой. Сшивание антигена-мишени представляет собой тип связывания. В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO перекрестно сшивает MARCO с MARCO на MARCO+ клетке.

[0430] Термин «аффинность» относится к силе суммарных общих нековалентных взаимодействий между одиночным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнера по связыванию (например, антигена или эпитопа). Если не указано иное, используемый в данном документе термин «связывание» относится к действительной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие в соотношении 1:1 между членами связывающей пары (например, антителом и антигеном или эпитопом). Аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y может быть представлена константой диссоциации (K_D). Кинетические компоненты, которые вносят вклад в константу равновесия диссоциации, более подробно описаны ниже. Аффинность можно измерить обычными методами, известными в данной области техники, в том числе описанными в данном документе, такими как технология поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, BIACORE[®]) или биослойная интерферометрия (например, FORTEBIO[®]).

[0431] Термин « k_d » (s^{-1}), используемый в данном документе, относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Это значение также называют значением k_{off} .

[0432] Термин « k_a » ($M^{-1} \times s^{-1}$), используемый в данном документе, относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Это значение также называется значением k_{on} .

[0433] В контексте данного документа термин « K_D » (M) относится к константе равновесия диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. $K_D = k_d/k_a$. В некоторых вариантах осуществления аффинность антитела описывается в терминах K_D для взаимодействия между таким антителом и его антигеном. Для ясности, как известно в данной области техники, меньшее значение K_D указывает на более высокую аффинность взаимодействия, в то время как большее значение K_D указывает на более низкую аффинность взаимодействия.

[0434] В контексте данного документа термин « K_A » (M^{-1}) относится к константе равновесия ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. $K_A = k_a/k_d$.

[0435] При использовании в данном документе в контексте двух или более антител термин «конкурирует с» или «перекрестно конкурирует с» указывает на то, что два или более антитела конкурируют за связывание с антигеном (например, MARCO). В одном из примеров анализа MARCO наносят на поверхность и приводят в контакт с первым

антителом к MARCO, после чего добавляют второе антитело к MARCO. В еще одном примере анализа первое антитело к MARCO наносят на поверхность и приводят в контакт с MARCO, а затем добавляют второе антитело к MARCO. Если присутствие первого антитела к MARCO снижает связывание второго антитела к MARCO в любом анализе, тогда антитела конкурируют друг с другом. Термин «конкурирует с» также включает комбинации антител, в которых одно антитело снижает связывание другого антитела, но где не наблюдается конкуренции, когда антитела добавляются в обратном порядке. Однако в некоторых вариантах осуществления первое и второе антитела ингибируют связывание друг друга независимо от порядка, в котором они добавлены. В некоторых вариантах осуществления одно антитело снижает связывание другого антитела с его антигеном по меньшей мере на 25%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95%. Квалифицированный специалист может выбрать концентрации антител, используемых в конкурентных анализах, на основании аффинности антител к MARCO и валентности антител. Анализы, описанные в этом определении, являются иллюстративными, и квалифицированный специалист может использовать любой подходящий анализ для определения того, конкурируют ли антитела друг с другом. Подходящие анализы описаны, например, в Cox et al., “Immunoassay Methods,” in Assay Guidance Manual [Internet], Updated December 24, 2014 (ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/; по состоянию на 29 сентября, 2015); Silman et al., *Cytometry*, 2001, 44:30-37; и Finco et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011, 54:351-358; каждый из которых включен в полном объеме посредством ссылки.

[0436] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело связывает MARCO человека. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело связывает MARCO мыши. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело связывает MARCO макака-резуса. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело связывает MARCO яванского макака. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело связывает MARCO человека, макака-резуса и/или яванского макака.

[0437] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело связывает MARCO человека с K_D , меньшей или равной около 0,001, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 1,95, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10×10^{-9} М, по данным анализа Вiascore. В некоторых вариантах осуществления K_D антитела, предложенного в данном документе, составляет около 0,001-0,01, 0,01-0,1, 0,01-0,05, 0,05-0,1, 0,1-0,5, 0,5-1, 0,25-0,75, 0,25-0,5, 0,5-0,75, 0,75-1, 0,75-2, 1,1-1,2, 1,2-1,3, 1,3-1,4, 1,4-1,5, 1,5-1,6, 1,6-1,7, 1,7-1,8, 1,8-1,9, 1,9-2, 1-2, 1-5, 2-7, 3-8, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 7-10 или $5-10 \times 10^{-9}$ М, по данным анализа Вiascore.

[0438] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело связывает MARCO человека с K_D , меньшей или равной около 2, 1,98, 1,95, 1,9,

1,85, 1,8, 1,75, 1,7, 1,65, 1,6, 1,55, 1,50, 1,45 или $1,4 \times 10^{-9}$ М или менее, по данным анализа Вiasoge. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело связывает MARCO человека с K_D в диапазоне 1,9-1,8, 1,8-1,7, 1,7-1,6, 1,6-1,5 или $1,9-1,5 \times 10^{-9}$ М по данным анализа Вiasoge. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело связывает MARCO человека с K_d , меньшим или равным около 10, 9,56, 9,5, 9,0, 8,88, 8,84, 8,5, 8, 7,5, 7,32, 7, 6,5, 6, 5,5, 5, 4,5, 4, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5 или 1×10^{-4} (1/с) или менее, по данным анализа Вiasoge. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело связывает MARCO человека с K_d 7-10 в диапазоне 7-8, 8-9, 9-10, 7-7,5, 7,5-8, 8,-8,5, 8,5-9, 9-9,5 или $9,5-10 \times 10^{-4}$ (1/с) по данным анализа Вiasoge. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело связывает MARCO человека с K_a , большей или равной около 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 4,5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 7, 8, 9, или 10×10^5 (1/Мс), или более, по данным анализа Вiasoge. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело связывает MARCO человека с K_a 4-7 в диапазоне 4-4,5, 4,5-5, 5-5,5, 5,5-6, 6-6,5, или 6,5-7, 7-8, 8-9, или $9-10 \times 10^5$ (1/Мс), по данным анализа Вiasoge.

[0439] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело связывает MARCO человека с EC50, меньшей или равной 2, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления антитело связывает MARCO человека со значением EC50 в диапазоне 0,6-1,4 нМ по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления антитело связывает MARCO человека с EC50 около 0,5, 0,6, 0,9, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 или 1,5 нМ по данным проточной цитометрии.

[0440] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело связывает MARCO мыши со значением EC50, меньшим или равным 2, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 нМ по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления антитело связывает MARCO мыши со значением EC50 в диапазоне 0,6-1,4 нМ по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления антитело связывает MARCO мыши с EC50 около 0,5, 0,6, 0,9, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 или 1,5 нМ по данным проточной цитометрии.

[0441] В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело не связывает MARCO человека с EC50, превышающим или равным 20 нМ или более по данным проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело не связывается с мышью MARCO со значением EC50, превышающим или равным 3 нМ или более по данным проточной цитометрии.

[0442] Для скрининга антител, которые связываются с эпитопом антигена-мишени, связанного с представляющим интерес антителом (например, MARCO), может быть выполнен стандартный анализ перекрестного блокирования, такой как описанный в *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane

(1988). Альтернативно или дополнительно картирование эпитопов может быть выполнено способами, известными в данной области техники.

[0443] Конкуренцию между антителами можно определить с помощью анализа, в котором тестируемое антитело ингибирует или блокирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 50:1495, 1990; Fendly et al. *Cancer Research* 50: 1550-1558; US 6949245). Тестируемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если избыток тестируемого антитела (например, по меньшей мере 2х, 5х, 10х, 20х или 100х) ингибирует или блокирует связывание эталонного антитела, например, по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания. Антитела, идентифицируемые в конкурентном анализе (конкурирующее антитело), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, и антитела, связывающиеся со смежным эпитопом, расположенным достаточно близко к эпитопу, связываемому эталонному антителу, для появления стерического затруднения для антител. Например, можно идентифицировать второе конкурирующее антитело, которое конкурирует за связывание с MARCO с первым описанным в данном документе антителом. В определенных случаях второе антитело может блокировать или ингибировать связывание первого антитела, например, на по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%, как измеряется в анализе конкурентного связывания. В определенных случаях второе антитело может замещать первое антитело более чем на 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%.

[0444] В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с богатым цистеином доменом рецептора-мусорщика (SRCR), MARCO.

[0445] В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом на SRCR, содержащим по меньшей мере один из остатков Q452, Y472 или K473 человеческого MARCO дикого типа (SEQ ID NO: 363). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом на SRCR, содержащим по меньшей мере один из остатков H505, D507, S509 или E511 человеческого MARCO дикого типа (SEQ ID NO: 363). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом на SRCR, содержащим по меньшей мере один из остатков E450, Q452, Q487 или T499 человеческого MARCO дикого типа (SEQ ID NO: 363). В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом на SRCR, содержащим по меньшей мере один из остатков E450, Q452, Q487, T499, H505, D507, S509 или E511 человеческого MARCO дикого типа (SEQ ID NO: 363).

[0446] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с по меньшей мере одним из следующих остатков: Q452, Y472, K473, E450, Q487, T499, H505, D507, S509, или E511 из MARCO, перечисленных в SEQ ID NO: 363. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью, девятью или десятью из следующих остатков:

Q452, Y472, K473, E450, Q487, T499, H505, D507, S509 или E511 из SEQ ID NO: 363. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с двумя из следующих остатков: Q452, Y472, K473, E450, Q487, T499, H505, D507, S509, или E511 из SEQ ID NO: 363. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с тремя из следующих остатков: Q452, Y472, K473, E450, Q487, T499, H505, D507, S509, или E511 из SEQ ID NO: 363. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с четырьмя из следующих остатков: Q452, Y472, K473, E450, Q487, T499, H505, D507, S509, или E511 из SEQ ID NO: 363.

[0447] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с Q452. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с Y472. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с K473. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с E450. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с Q487. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с T499. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с H505. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с D507. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с S509. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с E511.

Функция

[0448] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (АЗКЦ). АЗКЦ может возникать, когда антитела связываются с антигенами на поверхности патогенных или онкогенных клеток-мишеней. Эффекторные клетки, несущие Fc-гамма-рецепторы (FcγR или FCGR) на своей клеточной поверхности, включая цитотоксические Т-клетки, природные клетки-киллеры (NK), макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, дендритные клетки или моноциты, распознают и связывают область Fc антител, связанных с клетками-мишенями. Такое связывание может запускать активацию внутриклеточных сигнальных путей, ведущих к гибели клеток. В конкретных вариантах осуществления подтипы (изоотипы) области Fc иммуноглобулина антитела включают IgG1 и IgG3 человека. В контексте данного документа АЗКЦ относится к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы (FcR) (например, Природные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги) распознают

связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени. Первичные клетки, опосредующие АЗКЦ, НК-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках приведена в таблице 3 на странице 464 в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Для оценки активности АЗКЦ представляющей интерес молекулы может быть проведен анализ АЗКЦ *in vitro*, описанный в патенте США № 5500362 или 5821337. Эффекторные клетки, пригодные для такого анализа, включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) и природные клетки-киллеры (НК). В качестве альтернативы или дополнения, активность АЗКЦ молекулы, представляющей интерес, можно оценить *in vivo*, например, в животной модели, например, согласно описанию в публикации Clynes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 (1998).

[0449] В некоторых вариантах осуществления антитело имеет активность комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ). Индуцированная антителами КЗЦ опосредуется через белки классического каскада комплемента и запускается связыванием белка комплемента C1q с антителом. Связывание области Fc антитела с C1q может вызывать активацию каскада комплемента. В конкретных вариантах осуществления подтипы (изотипы) области Fc иммуноглобулина антитела включают IgG1 и IgG3 человека. В контексте данного документа КЗЦ относится к способности молекулы лизировать мишень в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, полипептидом (например, антителом)), образующей комплекс с распознаваемым антигеном. Для оценки активации комплемента, может быть выполнен анализ КЗЦ, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

[0450] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой агонистическое антитело. Агонистическое антитело может индуцировать (например, усиливать) одну или более активностей или функций клеток, экспрессирующих MARCO, после того, как антитело связывает белок MARCO, экспрессирующийся на клетке. Агонистическое антитело может связываться с клетками, экспрессирующими MARCO, и активировать их, вызывая изменения в пролиферации клеток или изменяя способность презентации антигена. Агонистическое антитело может связываться с клетками, экспрессирующими MARCO, и активировать их, запуская внутриклеточные сигнальные пути, которые приводят к изменению роста клеток или апоптозу.

[0451] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антагонистическое антитело. Антагонистическое антитело может блокировать (например, уменьшать) одну или более активностей или функций клеток, экспрессирующих MARCO, после того, как антитело связывает белок MARCO, экспрессируемый на клетке. Например, антагонистическое антитело может связываться и блокировать связывание лиганда с одним или более белками MARCO, предотвращая дифференцировку и

пролиферацию клетки или изменяя способность презентации антигена. Антагонистическое антитело может связываться с белком MARCO его лигандом и предотвращать его активацию, изменяя внутриклеточные сигнальные пути, которые способствуют росту и выживаемости клеток.

[0452] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой истощающее антитело. Истощающее антитело представляет собой антитело, которое убивает экспрессирующую MARCO клетку при контакте посредством взаимодействия антитела с другими иммунными клетками или молекулами. Например, антитела, связываясь с клетками, несущими белки MARCO, могут вовлекать белки комплемента и вызывать комплемент-зависимый лизис клеток. Антитела, когда они связываются с клетками, несущими белки MARCO, могут также вызывать гибель соседних клеток, несущих Fc-рецепторы, посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ).

[0453] В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой нейтрализующее антитело, и антитело нейтрализует одну или более биологических активностей экспрессирующих MARCO клеток. В некоторых вариантах осуществления белок MARCO экспрессируется на поверхности экспрессирующих MARCO клеток, и антитело распознает внеклеточный домен белка MARCO.

[0454] В некоторых вариантах осуществления антитело является селективным в отношении экспрессирующих MARCO клеток (предпочтительно связывается с MARCO). В определенных вариантах осуществления антитело, которое селективно связывается с экспрессирующими MARCO клетками, имеет константу диссоциации (K_d) в диапазоне от 0,0001 нМ до 1 мкМ. В определенных вариантах осуществления антитело специфически связывается с эпитопом на белке MARCO, который является консервативным среди белков разных видов. В еще одном варианте осуществления селективное связывание включает, но не требует, исключительное связывание.

[0455] В одном варианте осуществления антитело к MARCO, связанное со своей мишенью, вызывает истощение *in vivo* экспрессирующих MARCO клеток, с которыми оно связано. В некоторых вариантах осуществления эффекторные белки, индуцированные кластерными антителами, могут запускать различные ответы, включая высвобождение воспалительных цитокинов, регуляцию продукции антигена, эндоцитоз или уничтожение клеток. В одном варианте осуществления антитело способно рекрутировать и активировать комплемент или опосредовать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) *in vivo*, или опосредовать фагоцитоз путем связывания Fc-рецепторов *in vivo*. Антитело может также истощать экспрессирующие MARCO клетки, индуцируя апоптоз или некроз экспрессирующих MARCO клеток при связывании.

[0456] В некоторых вариантах осуществления инактивация экспрессирующих MARCO клеток осуществляется *in vitro* и достигается: а) путем уничтожения экспрессирующих MARCO клеток; б) истощения экспрессирующих MARCO клеток с

помощью магнитных частиц; или с) сортировки экспрессирующих MARCO клеток с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

[0457] В некоторых вариантах осуществления антитело связано или конъюгировано с эффекторной молекулой. В конкретных вариантах осуществления антитело конъюгировано по меньшей мере с одним терапевтическим агентом, выбранным из группы, состоящей из радионуклида, цитотоксина, химиотерапевтического агента, лекарственного средства, пролекарства, токсина, фермента, иммуномодулятора, антиангиогенного агента, проапоптотического агента, цитокина, гормона, олигонуклеотида, антисмысловой молекулы, кРНК, второго антитела и фрагмента второго антитела.

[0458] В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгируют с лекарственным средством, например, токсином, химиотерапевтическим агентом, иммуномодулятором или радиоактивным изотопом. Существует несколько способов получения ADC (конъюгаты антитело-лекарственное средство), известных в данной области техники и описанных в патентах США, например, 8624003 (метод колпака), 8163888 (одноэтапный метод) и 5208020 (двухэтапный метод). Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно конъюгировать по меньшей мере с одним агентом, включая радионуклид, цитотоксин, химиотерапевтический агент, лекарственное средство, пролекарство, токсин, фермент, иммуномодулятор, антиангиогенный агент, проапоптотический агент, цитокин, гормон, олигонуклеотид, антисмысловую молекулу, кРНК, второе антитело и второй фрагмент антитела, который связывается с антигеном.

[0459] В некоторых вариантах осуществления антитело модулирует иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления антитело усиливает иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления антитело усиливает или инициирует иммунный ответ.

Способы лечения рака

[0460] В еще одном аспекте в изобретении предложены способы лечения связанного с иммунной системой патологического состояния (например, рака) у индивида, включающие введение индивиду эффективного количества композиции, содержащей антитело к MARCO. В еще одном аспекте изобретение представлены способы усиления иммунного ответа у индивида, включающие введение индивиду эффективного количества композиции, содержащей антитело к MARCO.

[0461] В некоторых вариантах осуществления способы, предложенные в данном документе, полезны для лечения связанного с иммунной системой патологического состояния у индивида. В одном варианте осуществления индивид представляет собой человека.

[0462] В некоторых вариантах осуществления способы, предложенные в данном документе (такие как способы усиления иммунного ответа), применимы для лечения рака, и поэтому индивид, получающий антитело к MARCO, болен злокачественным новообразованием. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой

солидный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления рак ускользает от иммунологического надзора. В некоторых вариантах осуществления рак является иммунореактивным. В некоторых вариантах осуществления при злокачественном новообразовании экспрессируется IL-10. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гипоксический рак. В определенных вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из: рака легкого, аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака почки, рака печени, почечно-клеточного рака, рака шейки матки, рака яичников, колоректального рака, рака толстой кишки, нейробластомы, рака молочной железы, трижды негативного рака молочной железы, базальноподобного рака молочной железы, рака желудка, рака желудка, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака кожи, лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, неходжкинской лимфомы, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака эндометрия, рака головы и шеи или плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSC). В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак толстой кишки, рак молочной железы, базальноподобный рак молочной железы, рак яичников или рак желудка.

[0463] В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к уменьшению объема или размера злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления лечение эффективно для уменьшения объема злокачественной опухоли по сравнению с объемом злокачественной опухоли до введения антитела. В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к снижению скорости роста злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления лечение эффективно для снижения скорости роста злокачественной опухоли по сравнению со скоростью роста злокачественной опухоли до введения антитела. В некоторых вариантах осуществления лечение эффективно для устранения злокачественной опухоли.

[0464] В некоторых вариантах осуществления MARCO экспрессируется на более высоком уровне в раковой клетке по сравнению с нераковой клеткой. В некоторых вариантах осуществления IL-10 экспрессируется на более высоком уровне в раковой клетке по сравнению с нераковой клеткой. Уровни MARCO и/или IL-10 могут быть оценены любым методом, известным в данной области техники, включая, помимо прочего, анализы белков или анализы нуклеиновых кислот, такие как FACS, вестерн-блоттинг, ИФА, иммунопреципитацию, иммуногистохимию, моноплексную иммуногистохимию, мультиплексную иммуногистохимию, проточную цитометрию, иммунофлуоресценцию, радиоиммуноанализ, дот-блоттинг, методы иммунодетекции, поверхностный плазмонный резонанс, оптическую спектроскопию, масс-спектрометрию, ВЭЖХ, кПЦР, ОТ-кПЦР, мультиплексную кПЦР или ОТ-кПЦР, секвенирование РНК, микроматричный анализ, серийный анализ экспрессии генов, метод MassARRAY, Luminex, MSD и флуоресцентную гибридизацию *in situ* и их комбинации.

Комбинированные терапии

[0465] Для лечения рака антитело к MARCO может быть комбинировано с одним или более антителами, которые ингибируют белки иммунных контрольных точек. Особый интерес представляют белки иммунных контрольных точек, которые экспонируются на поверхности опухолевой клетки. Рецепторы иммунных контрольных точек, которые наиболее активно изучались в контексте клинической противораковой иммунотерапии, цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный антиген 4 (CTLA4; также известный как CD152) и белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD1; также известный как CD279), являются ингибирующими рецепторами. Клиническая активность антител, которые блокируют любой из этих рецепторов, предполагает, что противоопухолевый иммунитет может быть усилен на нескольких уровнях и что комбинаторные стратегии могут быть разумно разработаны, руководствуясь механистическими соображениями и доклиническими моделями.

[0466] Двумя лигандами для PD-1 являются лиганд 1 PD-1 (PD-L1; также известный как B7-H1 и CD274) и PD-L2 (также известный как B7-DC и CD273). PD-L1 экспрессируется на раковых клетках и, связываясь со своим рецептором PD-1 на Т-клетках, ингибирует активацию/функцию Т-клеток. Ингибиторы, которые блокируют взаимодействие PD-1 с его когнатными лигандами на раковых клетках, PD-L1 и PD-L2, могут привести как к повышению активации и функции Т-клеток, так и к предотвращению уклонения раковых клеток от иммунной системы.

[0467] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия включает в себя агент, который препятствует связыванию PD-1 и PD-L1 или PD-L2. В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия включает в себя антитело к PD1. В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия включает в себя антитело к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия включает в себя антитело к PD-L2.

[0468] Различные антитела PD-1, PD-L1 и PD-L2 известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой по меньшей мере одно из: атезолизумаба (PD-L1), авелумаба (PD-L1), дурвалумаба (PD-L1), ниволумаба (PD-1), пембролизумаба (PD-1), цемиплимаба (PD-1), ипилимумаба (CTLA-4), тремелиумаба (CTLA-4) или любой их комбинации.

[0469] Дополнительный терапевтический агент может быть введен любым подходящим способом. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, и дополнительный терапевтический агент включены в одну и ту же фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления антитело, представленное в данном документе, и дополнительный терапевтический агент включены в различные фармацевтические композиции.

[0470] В вариантах осуществления, когда антитело, представленное в данном документе, и дополнительный терапевтический агент включены в различные фармацевтические композиции, введение антитела может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента.

Способ иммуномодуляции

[0471] Иммуносупрессивные M2-подобные клетки, экспрессирующие MARCO, такие как MARCO⁺ ассоциированные с опухолью макрофаги (TAM), и MARCO⁺ mMDSC, активируются в обогащенной IL-10 и гипоксическом опухолевом микроокружении (TME). Эти клетки подавляют иммунную цитотоксическую активность. Иммуносупрессия также приводит к усилению ангиогенеза и метастазированию.

[0472] Антитела к MARCO могут активировать внутриопухолевый иммунитет, по меньшей мере, опосредуя реполяризацию MARCO⁺ миелоидных M2-подобных TAM в M1-подобные TAM и реполяризацию mMDSC в провоспалительные моноциты. Эта реполяризация может привести к продукции цитокинов, хемокинов и рецепторов активации, что, в свою очередь, приводит к активации Т-клеток, В-клеток и NK-клеток. Реполяризация миелоидных M2-подобных TAM и mMDSC может активировать Т-клетки, В-клетки и NK-клетки. После активации эти NK-клетки, CD8⁺ Т-клетки, M1-подобные TAM и воспалительные моноциты могут вызывать разрушение опухоли. Кроме того, противоопухолевый иммунитет можно модулировать за счет снижения M2-подобных TAM и иммуносупрессивных mMDSC. Противоопухолевый иммунитет также может быть опосредован усиленной презентацией антигена и активацией клеток селезенки и лимфатических узлов. Связывание антитела к MARCO с макрофагами медуллярной связки (MCM) может вызывать изменения адгезии и подвижности в лимфатическом узле, а связывание антитела к MARCO с макрофагами маргинальной зоны (MZM) в селезенке может приводить к изменениям адгезии и подвижности, что приводит к потенциальной активации В-клеток.

[0473] В некоторых вариантах осуществления реполяризация MARCO⁺ клеток наблюдается за счет быстрой модуляции фосфо-сигнальных каскадов, участвующих в молекулярной ассоциации, ферментативной активности, транскрипции, трансляции и провоспалительном сигналинге (Src, SYK, NF- κ B, PI3K/AKT, TLR, STAT6, IL2RA, CAMK, PKC, Raf1, TPL2, MAPK, клеточный цикл, выживаемость, клеточная адгезия и миграция, перестройка цитоскелета); изменения в фагоцитозе, адгезии, подвижности и хемотаксисе; активации репортерной активности NF- κ B в качестве монотерапии и в комбинации с агонистами TLR; индукции секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов, включая, помимо прочего, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL7R, IL-12, IL12-p70, IL-15, IL-18, IL-27, IP-10, IFN- γ , TNF α , MIP1- α , MIP1- β , MIP-2, CSF2, CSF3, G-CSF, M-CSF, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CCL24, CXCL1, CXCL3, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, GRO-альфа, MCP-1, MCP-3, LIF эотаксин; усиления активации воспалительных процессов и фагоцитоза.

[0474] Описанные в данном документе способы введения антитела к MARCO могут приводить к модуляции иммунного ответа. Модуляция может представлять собой увеличение или уменьшение иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления модуляция представляет собой усиление иммунного ответа.

[0475] В одном аспекте введение антитела к MARCO, как описано в данном документе, может привести к индукции провоспалительных молекул, таких как цитокины, хемокины, или экспрессии миелоидных активирующих рецепторов миелоидными клетками. Как правило, индуцированные провоспалительные молекулы присутствуют на уровнях, превышающих уровень, достигнутый при использовании изотипического контроля. В некоторых вариантах осуществления миелоидные клетки представляют собой экспрессирующие MARCO (MARCO+) клетки. В некоторых вариантах осуществления MARCO+ миелоидная клетка представляет собой моноцит или макрофаг. В некоторых вариантах осуществления MARCO+ макрофаг представляет собой ассоциированный с опухолью макрофаг (TAM), или моноцитарный макрофаг (MDM). Такие провоспалительные молекулы, в свою очередь, приводят к активации противоопухолевого иммунитета, включая, помимо прочего, активацию Т-клеток, пролиферацию Т-клеток, дифференцировку Т-клеток, активацию M1-подобных макрофагов, регуляцию В-клеток и активацию NK-клеток. Таким образом, введение антитела к MARCO может вызвать множественные противоопухолевые иммунные механизмы, которые приводят к разрушению опухоли.

[0476] В еще одном аспекте в данном документе предложены способы усиления иммунного ответа у индивида, включающие введение индивиду эффективного количества композиции, содержащей антитело к MARCO или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления способ усиления иммунного ответа у субъекта включает введение субъекту антитела, которое связывается с доменом SRCR MARCO человека (SEQ ID NO: 363). В некоторых вариантах осуществления способ усиления иммунного ответа у субъекта включает введение субъекту антитела, которое конкурирует за связывание с MARCO человека (SEQ ID NO: 363) с эталонным антителом. В некоторых вариантах осуществления способ усиления иммунного ответа у субъекта включает введение субъекту антитела, которое конкурирует за связывание с MARCO человека (SEQ ID NO: 363), где антитело связывается по меньшей мере с одним из остатков Q452, Y472, и K473 из MARCO человека (SEQ ID NO: 363). В некоторых вариантах осуществления способ усиления иммунного ответа у субъекта включает введение субъекту антитела, которое конкурирует за связывание с MARCO человека (SEQ ID NO: 363), где указанное антитело связывается по меньшей мере с одним из остатков E450, Q452, Q487 и T499 MARCO человека (SEQ ID NO: 363). В некоторых вариантах осуществления способ усиления иммунного ответа у субъекта включает введение субъекту антитела, которое конкурирует за связывание с MARCO человека (SEQ ID NO: 363), где антитело связывается по меньшей мере с одним из остатков H505, D507, S509 или E511 из MARCO человека (SEQ ID NO: 363).

[0477] В некоторых вариантах осуществления антитело присутствует в фармацевтической композиции, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0478] В любом и всех аспектах усиления иммунного ответа, как описано в данном документе, любое увеличение или уменьшение или изменение аспекта характеристик(-и) или функции(-й) сравнивается с клеткой, которую не приводили в контакт с антигеном к MARCO.

[0479] Повышение иммунного ответа может быть как усилением иммунного ответа, так и индуцированием иммунного ответа. Например, усиление иммунного ответа включает в себя как начало или инициацию иммунного ответа, так и наращивание или усиление текущего или существующего иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления лечение индуцирует иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления индуцированный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления индуцированный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления лечение усиливает иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления лечение усиливает иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления повышенный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления повышенный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ запускается или иницируется введением антигена к MARCO. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ усиливается введением антигена к MARCO.

[0480] В другом аспекте в настоящей заявке предложены способы приведения в контакт клетки с антигеном к MARCO, что приводит к модуляции иммунной функции клетки. Модуляция может заключаться в усилении иммунного ответа или перепрограммировании экспрессирующих MARCO клеток. В некоторых вариантах осуществления модуляция представляет собой повышение иммунной функции. В некоторых вариантах модулирование функции приводит к активации экспрессирующих MARCO миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения модуляция функции приводит к перепрограммированию экспрессирующих MARCO миелоидных клеток.

[0481] В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой экспрессирующие MARCO клетки (MARCO+ клетки). В некоторых вариантах осуществления MARCO+ клетки представляют собой один или более моноцитов, макрофагов, ассоциированных с опухолью макрофагов (TAM), и моноцитарных макрофагов (MDM). В некоторых вариантах осуществления MARCO+ клетка представляет собой моноцит. В некоторых вариантах осуществления MARCO+ клетка представляет собой макрофаг. В некоторых вариантах осуществления MARCO+ клетка представляет собой ассоциированный с опухолью макрофаг (TAM). В некоторых

вариантах осуществления MARCO+ клетка представляет собой моноцитарный макрофаг (MDM). В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт экспрессирующей MARCO клетки с антителом к MARCO индуцирует активацию клетки.

[0482] В некоторых вариантах модуляция функции MARCO+ клеток приводит к увеличению способности клеток стимулировать как нативные, так и активированные CD8+ Т-клетки, например, путем увеличения способности экспрессирующих MARCO клеток перекрестно презентировать опухолевый антиген на молекулах MHC I наивным CD8+ Т-клеткам или путем увеличения секреции цитокинов или хемокинов экспрессирующими MARCO клетками. В некоторых вариантах модулирование функции MARCO+ клеток приводит к увеличению способности клеток стимулировать как нативные, так и активированные CD4+ Т-клетки, например, путем повышения способности экспрессирующих MARCO клеток перекрестно презентировать опухолевый антиген на молекулах MHC II наивным CD4+ Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления модуляция функции усиливает или увеличивает способность клеток продуцировать цитокины, хемокины, костимулирующие или активирующие рецепторы. В некоторых вариантах осуществления модуляция повышает стимулирующую в отношении Т-клеток функцию MARCO+ клетки, включая, например, способность клеток запускать сигналинг Т-клеточного рецептора (TCR), пролиферацию Т-клеток или продукцию Т-клеточных цитокинов.

[0483] В некоторых вариантах осуществления повышенный иммунный ответ представляет собой секрецию цитокинов и хемокинов. В некоторых вариантах осуществления антитело MARCO обладает агонистической активностью. В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO индуцирует повышенную экспрессию по меньшей мере одного цитокина или хемокина в клетке по сравнению с изотипическим контрольным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO индуцирует повышенную экспрессию по меньшей мере одного провоспалительного цитокина или хемокина в клетке по сравнению с изотипическим контрольным антителом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один цитокин или хемокин выбран из группы, состоящей из: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL7R, IL-12, IL12-p70, IL-15, IL-18, IL-27, IP-10, IFN- γ , TNF α , MIP1- α , MIP1- β , MIP-2, CSF2, CSF3, G-CSF, M-CSF, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CCL24, CXCL1, CXCL3, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, GRO-альфа, MCP-1, MCP-3, LIF, или эотаксина. В некоторых вариантах осуществления цитокин или хемокин представляет собой IL-2. В некоторых вариантах осуществления цитокин или хемокин представляет собой IL-12. В некоторых вариантах осуществления секреция цитокинов или хемокинов увеличивается в около 1-100 раз, в 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90 или 90-100 раз по сравнению с необработанной клеткой или клеткой, обработанной изотипическим контрольным антителом. В некоторых вариантах осуществления хемокин представляет собой IL-2, и секреция увеличивается в около 1-100 раз, 1 раз, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 1-10 раз, 10-20 раз, 20-30 раз, 30-40

раз, 40-50 раз, 50-60 раз, 60-70 раз, 70-80 раз, 80-90 раз или 90-100 раз по сравнению с необработанной клеткой или клеткой, обработанной изотипическим контрольным антителом. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой IL-12, и его секреция увеличивается в около 1-100 раз, 1 раз, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз, 100 раз, 1-10 раз, 10-20 раз, 20-30 раз, 30-40 раз, 40-50 раз, 50-60 раз, 60-70 раз, 70-80 раз, 80-90 раз или 90-100 раз по сравнению с необработанной клеткой или клеткой, обработанной изотипическим контрольным антителом.

[0484] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO индуцирует снижение экспрессии по меньшей мере одного гена в клетке по сравнению с изотипическим контрольным антителом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ген представляет собой ALK, MPB, TMEM37, NHSL2 или SLC46A2. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена уменьшается примерно в 1-100 раз: 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90 или 90-100 раз по сравнению с необработанной клеткой или клеткой, обработанной изотипическим контрольным антителом.

[0485] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO индуцирует активацию инфламмасом по сравнению с изотипическим контрольным антителом. Активацию инфламмасом можно определить путем измерения секреции IL-1 β и/или IL-18.

[0486] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO индуцирует реполяризацию миелоидных M2-подобных TAM в M1-подобные TAM и/или реполяризацию mMDSC в провоспалительные моноциты по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0487] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO увеличивает количество CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, НК-клеток, дендритных клеток, МНСII^{high} моноцитов, МНСII^{mid} моноцитов, макрофагов маргинальной зоны, фолликулярных В-клеток и/или макрофагов красной пульпы по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0488] В некоторых вариантах осуществления при контакте с клетками антитело снижает количество TAM, нейтрофилов, В-клеток маргинальной зоны, CD19⁺ В-клеток и/или МНСII-моноцитов по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0489] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO модулирует изменения подвижности и/или фагоцитоза путем изменения путей цитоскелета, актина и мышц, а также связанных с клеточной адгезией путей в опухоли. В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO приводит к провоспалительной активации в TME, включая перепрограммирование макрофагов с M2 на M1, усиление фагоцитоза и/или инфламмасом, активацию НК-клеток и/или активацию Т-клеток.

[0490] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO модулирует клеточный сигналинг, клеточную адгезию, изменения цитоскелета и подвижности в лимфатических узлах. В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO

связывается с макрофагами медуллярной связки в лимфатических узлах и модулирует адгезию и подвижность клеток.

[0491] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO модулирует клеточную адгезию, цитоскелет, миграцию, подвижность, клеточный сигналинг и активацию В-клеток в селезенке. В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO связывается с макрофагами маргинальной зоны в селезенке и модулирует клеточную адгезию, подвижность и активацию В-клеток.

[0492] В некоторых вариантах осуществления модуляция увеличивает клеточную адгезию, цитоскелет и миграцию клеток по сравнению с изотипическим контрольным антителом. В некоторых вариантах осуществления модуляция индуцирует созревание В-клеток в селезенке по сравнению с изотипическим контрольным антителом. В некоторых вариантах осуществления модуляция индуцирует клеточные сигнальные пути, включающие пути клеточного цикла, Т-клеточного рецептора, фагоцитоза, аутофагии и пути wnt, по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0493] В некоторых вариантах осуществления усиленный иммунный ответ представляет собой рекрутинг и активацию противоопухолевых иммунных клеток.

[0494] В некоторых вариантах осуществления антитело индуцирует вторичный иммунный ответ по сравнению с изотипическим контрольным антителом. В целом, вторичный иммунный ответ представляет собой защитный иммунный ответ при последующем воздействии патогенов или антигенов, с которыми иммунная система сталкивалась ранее. Иллюстративные вторичные иммунные ответы включают иммунный ответ после инфекции или вакцинации антигеном. В целом, вторичные иммунные ответы опосредуются лимфоцитами, такими как Т-клетки или В-клетки. В некоторых вариантах осуществления вторичный иммунный ответ является защитным иммунным ответом на рак, включая рост, пролиферацию или метастазирование раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления вторичный иммунный ответ ингибирует, предотвращает или уменьшает рост, пролиферацию или метастазирование раковых клеток.

[0495] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO индуцирует или усиливает по меньшей мере один из следующих путей или ген, ассоциированные с: созреванием В-клеток в селезенке, путем актин-опосредованного клеточного сокращения, путем активации и активности киназы, сигнальным путем Toll-подобного рецептора, путями TLR 4 и 9, связыванием и активностью ГТФазы и/или путем сигнальной трансдукции RAS-Rho по сравнению с изотипическим антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO индуцирует или усиливает по меньшей мере один из следующих путей или ген, ассоциированные с: гуморальным иммунным ответом, NK-опосредованным иммунитетом, активацией NK, продукцией IL-2 и IL-12, уничтожением клеток, регуляцией эффекторного процесса, Т-клеточной пролиферацией, активацией, дифференцировкой, хемотаксисом и миграцией, межклеточной адгезией, фагоцитозом и/или миелоидной дифференцировкой, по сравнению с изотипическим антителом.

[0496] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO индуцирует или усиливает по меньшей мере один из следующих путей или ген, ассоциированные с: цитотоксичностью, опосредованной натуральными клетками-киллерами, сигнальным путем Т-клеточного рецептора, сигнальным путем JAK/STAT, взаимодействием цитокин-цитоклиновым рецептор, кишечной иммунной сетью для продукции IgA, трансэндотелиальной миграцией лейкоцитов, сигнальным путем хемокинов, линией дифференцировки гемопоэтических клеток, сахарным диабетом II типа и сигнальным путем Fc-эпсилон RI, по сравнению с изотипическим антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO снижает или подавляет по меньшей мере один из следующих путей или ген, ассоциированные с: гомологичной рекомбинацией, болезнью Альцгеймера, РНК-полимеразой, метаболизмом аргинина и пролина, цитратным циклом (циклом TCA), метаболизмом порфирина и хлорофилла, метаболизмом валина, деградацией лейцина и изолейцина, биосинтезом ненасыщенных жирных кислот, биосинтезом N-гликанов и биосинтезом аминокислот-тРНК, по сравнению с изотипическим антителом.

[0497] В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к MARCO индуцирует или усиливает по меньшей мере один из следующих путей или ген, ассоциированные с: взаимодействием цитокин-цитоклиновым рецептор, цитотоксичностью, опосредованной клетками натуральных киллеров, первичным иммунодефицитом, сигнальным путем хемокинов, линией дифференцировки гемопоэтических клеток, сигнальным путем JAK/STAT, сигнальным путем Т-клеточного рецептора, кишечной иммунной сетью для продукции IgA, взаимодействием нейроактивного лиганда с рецептором и сигнальным путем Fc-эпсилон RI, по сравнению с изотипическим антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO снижает или подавляет по меньшей мере один из следующих путей или ген, ассоциированные с: гликолизом, глюконеогенезом, метаболизмом пропаноата, протеасомой, цитратным циклом, циклом TCA, сокращением сердечной мышцы, болезнью Альцгеймера, болезнью Гентингтона, окислительным фосфорилированием, рибосомой, и болезнью Паркинсона, по сравнению с изотипическим антителом.

[0498] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO индуцирует или усиливает по меньшей мере один из следующих путей или ген, ассоциированные с: сигнальной системой фосфатидилинозитола, фокальной адгезией, метаболизмом инозитолфосфата, аксональным наведением, адгезионным контактом, путями при злокачественном новообразовании, регуляцией актинового цитоскелета, прогестероном-опосредованным созреванием ооцитов, сигнальным путем ERBB и сигнальным путем Wnt, по сравнению с изотипическим антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO снижает или подавляет по меньшей мере один из следующих путей или ген, ассоциированные с: биосинтезом аминокислот-тРНК, лизосомой, метаболизмом гистидина, метаболизмом лекарственных препаратов цитохромом p450, протеасомой,

болезнью Альцгеймера, болезнью Гентингтона, болезнью Паркинсона, окислительным фосфорилированием и рибосомой, по сравнению с изотипическим антителом.

[0499] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO индуцирует или усиливает по меньшей мере один из следующих путей или ген, ассоциированные с: фокальной адгезией, сигнальной системой фосфатидилинозита, сигнальным путем нейротрофина, сигнальным путем инсулина, метаболизмом инозитолфосфата, сигнальным путем MAPK, путями при рака, регуляцией актинового цитоскелета, сигнального пути ERBB и адгезионным контактом, по сравнению с изотипическими антителами. В некоторых вариантах осуществления антитело MARCO снижает или подавляет по меньшей мере один из следующих путей или ген, ассоциированные с: метаболизмом ксенобиотиков цитохромом p450, линией дифференцировки гемопоэтических клеток, лизосомой, болезнью Альцгеймера, протеасомой, взаимодействием цитокин-цитокинный рецептор, болезнью Гентингтона, болезнью Паркинсона, окислительным фосфорилированием и рибосомой, по сравнению с изотипическим антителом.

[0500] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO индуцирует или усиливает по меньшей мере один из следующих путей или ген, ассоциированные с: взаимодействием с рецептором ECM, фокальной адгезией, плотным контактом, адгезионным контактом, протеасомой, каскадами комплемента и коагуляции, молекулами клеточной адгезии и CAM, путями при злокачественной новообразовании, аритмогенной кардиомиопатией правого желудочка ARVC, сигнальном путем Wnt, регуляцией актинового скелета, аксональным наведением, болезнью Гентингтона, инфекцией, вызванной патогенной *Escherichia coli*, болезнью Альцгеймера, трансэндотелиальной миграцией лейкоцитов, взаимодействием цитокин-цитокинный рецептор, базально-клеточной карциномой, меланогенезом и сигнальным путем Hedgehog, по сравнению с изотипическим антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO снижает или подавляет по меньшей мере один из следующих путей или ген, ассоциированные с: клеточным циклом, биосинтезом аминокислот-тРНК, репарацией ошибочно спаренных оснований, биосинтезом гликозилфосфатидилинозитол ГФИ-якоря, метаболизмом глицерофосфолипидов и гомологичной рекомбинацией, по сравнению с изотипическим антителом.

[0501] В некоторых вариантах осуществления антитело MARCO индуцирует или усиливает по меньшей мере один из следующих путей или ген, связанный с: клеточным циклом, протеасомой, сигнальным путем Т-клеточного рецептора, репликацией ДНК, убиквитин-опосредованным протеолизом, регуляцией актинового цитоскелета, адгезионным контактом, инфекцией, вызванной патогенной *Escherichia coli*, базальными факторами транскрипции, пентозофосфатным путем, фагоцитозом, опосредованным Fc-гамма-R, сигнальным путем нейротрофинов, регуляцией аутофагии, гликолизом-глюконеогенезом, мейозом ооцитов, хроническим миелоидным лейкозом, цитратным циклом или циклом ТСА, сигнальным путем Wnt, сигнальным путем P53 и цитотоксичностью, опосредованной натуральными клетками-киллерами, по сравнению с

изотипическим антителом. В некоторых вариантах реализации антитело к MARCO снижает или подавляет по меньшей мере один из следующих путей или ген, ассоциированные с: переносчиками ABC, биосинтезом гликозилфосфатидилинозитол ГФИ-якоря, РНК-полимеразой, рибосомами, метаболизмом арахидоновой кислоты, метаболизмом глицерофосфолипидов, по сравнению с изотипическим антителом.

[0502] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO индуцирует сигналинг IL-2-STAT5, сигналинг NF- κ B, сигналинг TLR, сигналинг адгезии и подвижности, сигналинг перестройки цитоскелета, сигналинг TNF α через NF- κ B, сигналинг IL-6-JAK-STAT3, сигналинг SYK, сигналинг MAPK, сигналинг TPL2, кальциевый сигналинг, ответ IFN γ или ответ IFN α , комплемент, путь воспалительной реакции или пути отторжения аллотрансплантата, по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0503] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO снижает окислительное фосфорилирование, сигналинг mTOR, реакцию несвернутых белков, гомеостаз холестерина, метаболизм жирных кислот, мишени mTOR, пути гликолиза, путь клеточного цикла, выживаемость клеток, клеточную адгезию, путь мишеней E2F, гипоксию, сигнальный путь PI3K-AKT, сигнальный путь Src, сигнальный путь PKC, сигнальный путь эпителиально-мезенхимального перехода, окислительное фосфорилирование или сигнальные пути MAPK по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

[0504] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO индуцирует повышенную экспрессию по меньшей мере одного провоспалительного или активационного гена в клетке опухоли по сравнению с изотипическим контрольным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO индуцирует или увеличивает экспрессию по меньшей мере одного из следующих генов: Klrk1, Nrc1, Prf1, Cd40, Cd8 α , Nod2, Tlr4, Tnf, Nlrp3, Cd274, Clec9 α , Cd200r3, Il-27, Cxcl9, Cxcl10, или Cxcl12.

[0505] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO увеличивает количество CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, NK-клеток, дендритных клеток, МНСII⁺ макрофагов, МНСII^{high} моноцитов и/или МНСII^{mid} моноцитов в селезенке и/или опухоли.

[0506] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO увеличивает количество макрофагов, макрофагов маргинальной зоны, фолликулярных В-клеток и/или макрофагов красной пульпы в селезенке и/или опухоли.

[0507] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO снижает количество TAM, ассоциированных с опухолью нейтрофилов, В-клеток плазмы, В-клеток маргинальной зоны, CD19⁺ В-клеток, МНСII⁺ моноцитов и/или МНСII⁺ макрофагов в селезенке и/или опухоли.

[0508] В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии хемокина, цитокина, гена или пути определяют с помощью анализа нуклеиновой кислоты или белка.

Примеры анализов нуклеиновых кислот или белков включают, но не ограничиваются ими, FACS, вестерн-блоттинг, ИФА, иммунопреципитацию, иммуногистохимию, моноплексную иммуногистохимию, мультиплексную иммуногистохимию, иммунофлуоресценцию, радиоиммуноанализ, дот-блоттинг, методы иммунодетекции, ВЭЖХ, поверхностный плазмонный резонанс, оптическую спектроскопию, масс-спектрометрию, кПЦР, ОТ-кПЦР, мультиплексную кПЦР или ОТ-кПЦР, секвенирование РНК, микроматричный анализ, серийный анализ экспрессии генов, метод MassARRAY, Luminex, MSD и флуоресцентную гибридизацию *in situ* и их комбинации.

[0509] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO индуцирует изменения в клеточной адгезии, цитоскелете, хемотаксисе и миграции клеток при связывании с MARCO+ клеткой.

[0510] В некоторых вариантах осуществления антитело сшивает MARCO с MARCO на клеточной поверхности MARCO+ клетки. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт осуществляют *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт осуществляют *in vivo*. В некоторых конкретных вариантах осуществления приведение в контакт осуществляют *in vivo* в организме человека. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт осуществляет путем введения антитела к MARCO. В некоторых вариантах осуществления индивид, получающий антитело, (например, человек) болен злокачественным новообразованием.

Способы инактивации, уничтожения или истощения экспрессирующих MARCO клеток

[0511] В одном аспекте в настоящей заявке предложены способы приведения клеток в контакт с антителом к MARCO, таким как человеческое или гуманизированное антитело, что приводит к инактивации экспрессирующих MARCO клеток. Инактивация экспрессирующих MARCO клеток также включает уничтожение и/или истощение экспрессирующих MARCO клеток.

[0512] В еще одном аспекте в настоящей заявке предложены способы приведения в контакт экспрессирующих MARCO клеток с антителом к MARCO, что приводит к инактивации экспрессирующих MARCO клеток.

[0513] В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие MARCO клетки представляют собой миелоидные клетки. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие MARCO клетки представляют собой один или более моноцитов или макрофагов. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие MARCO клетки представляют собой одну или более клеток TAM и моноцитарных макрофагов (MDM). В некоторых вариантах осуществления MARCO-экспрессирующие клетки представляют собой моноцитарные клетки-супрессоры миелоидного происхождения (mMDSC).

[0514] В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке предложены способы инактивации экспрессирующих MARCO клеток, включающие приведение в контакт экспрессирующих MARCO клеток с антителом к MARCO, тем самым убивая экспрессирующие MARCO клетки. Отключение означает, что клетка становится частично

или полностью нефункциональной. В некоторых вариантах осуществления инактивация клеток приводит к индуцированию остановки роста клеток. В некоторых вариантах осуществления инактивация клеток приводит к апоптозу в клетках. В некоторых вариантах осуществления инактивация клеток приводит к лизису клеток, например, посредством комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ) или антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). В некоторых вариантах осуществления инактивация экспрессирующих MARCO клеток приводит к некрозу клеток. В некоторых вариантах осуществления инактивация экспрессирующих MARCO клеток приводит к индуцированию остановки роста клеток. В некоторых вариантах осуществления инактивация экспрессирующих MARCO клеток приводит к инактивации клеток. В некоторых вариантах осуществления инактивация экспрессирующих MARCO клеток приводит к нейтрализации активности белка MARCO в клетках. В некоторых вариантах осуществления инактивация экспрессирующих MARCO клеток приводит к снижению пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления инактивация экспрессирующих MARCO клеток приводит к дифференцировке клеток. В некоторых вариантах осуществления инактивация экспрессирующих MARCO клеток приводит к снижению способности клеток действовать как ингибирующие антигенпрезентирующие клетки или приводит к повышению способности клеток действовать как активирующие антигенпрезентирующие клетки. В некоторых вариантах осуществления инактивация экспрессирующих MARCO клеток приводит к неправильной локализации клеток в опухолевой ткани или опухолевом микроокружении (ТМЕ). В некоторых вариантах осуществления инактивация экспрессирующих MARCO клеток приводит к изменению пространственной организации клеток в опухолевой ткани или микроокружении опухоли. В некоторых вариантах осуществления инактивация экспрессирующих MARCO клеток приводит к изменению транзientной экспрессии клеток в опухолевой ткани или ТМЕ. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает удаление экспрессирующих MARCO клеток.

[0515] В любом и всех аспектах инактивация экспрессирующих MARCO клеток, как описано в данном документе, любое увеличение, уменьшение или изменение аспекта характеристики (характеристик) или функции (функций) сравнивается с клеткой, которую не приводили в контакт с антителом к MARCO.

[0516] В еще одном аспекте в настоящей заявке предложены способы приведения в контакт экспрессирующих MARCO клеток с антителом к MARCO, что приводит к модуляции функции экспрессирующих MARCO клеток. Модуляция может представлять собой любое одно или более из следующего. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие MARCO клетки представляют собой один или более моноцитов, макрофагов, TAM и MDM. В некоторых вариантах модулирование функции клеток приводит к увеличению способности клеток стимулировать как нативные, так и активированные CD8⁺ Т-клетки, например, путем повышения способности экспрессирующих MARCO клеток перекрестно презентировать опухолевый антиген на

молекулах MHC I наивным CD8⁺ Т-клеткам. В некоторых вариантах модулирование функции экспрессирующих MARCO клеток приводит к увеличению способности клеток стимулировать как нативные, так и активированные CD4⁺ Т-клетки, например, путем повышения способности экспрессирующих MARCO клеток перекрестно презентировать опухолевый антиген на молекулах MHC II наивным CD4⁺ Т-клеткам. В некоторых вариантах осуществления модуляция повышает стимулирующую в отношении Т-клеток функцию миелоидных клеток, включая, например, способность клеток запускать сигналинг Т-клеточного рецептора (TCR), пролиферацию Т-клеток или продукцию Т-клеточных цитокинов. В некоторых вариантах осуществления модуляция функции усиливает или увеличивает способность клеток продуцировать цитокины, хемокины, костимулирующие или активирующие рецепторы.

[0517] В любом и всех аспектах снижения функции экспрессирующих MARCO клеток, как описано в данном документе, любое увеличение, уменьшение или изменение аспекта характеристики (характеристик) или функции (функций) сравнивается с клеткой, которую не приводили в контакт с антителом к MARCO.

[0518] В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке предложены способы уничтожения (также называемые индуцированием гибели клеток) экспрессирующих MARCO клеток, включающие приведение в контакт экспрессирующих MARCO клеток с антителом к MARCO, тем самым уничтожая экспрессирующие MARCO клетки. В некоторых вариантах осуществления уничтожение увеличивается по сравнению с экспрессирующими MARCO клетками, которые не приводили в контакт с антителом к MARCO. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт индуцирует апоптоз в экспрессирующих MARCO клетках. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие MARCO клетки входят в популяцию иммунных клеток, включающую экспрессирующие MARCO клетки, и клетки, которые не экспрессируют MARCO. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает удаление экспрессирующих MARCO клеток. В некоторых вариантах осуществления погибает от 10% до 100% клеток. В некоторых вариантах осуществления, погибает по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% клеток.

[0519] В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие MARCO клетки уменьшаются количестве. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие MARCO клетки погибают, например, путем некроза или апоптоза. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие MARCO клетки индуцируют остановку роста. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие MARCO клетки больше не пролиферируют. В некоторых вариантах осуществления пространственная локализация экспрессирующих MARCO клеток изменена, и соотношение увеличено в определенной области TME. В некоторых вариантах осуществления изменяется транзистная экспрессия экспрессирующих MARCO клеток, и это соотношение увеличивается в течение определенного времени развития опухоли.

Дополнительные способы

Определение экспрессии MARCO

[0520] Также в данном документе предложены способы лечения рака или модулирования иммунного ответа у индивида, включающие: определение или проведение определения экспрессии MARCO у субъекта; и введение или проведение введения субъекту выделенного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, которые связываются с MARCO.

[0521] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение или проведение определения уровня экспрессии MARCO в биологическом образце, полученном от индивида. В некоторых вариантах осуществления биологический образец включает, помимо прочего, жидкость организма, образец ткани, образец органа, мочу, фекалии, кровь, слюну, спинномозговую жидкость и любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления биологический образец получен из опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии MARCO включает уровень экспрессии мРНК MARCO. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии MARCO включает уровень экспрессии белка MARCO. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии MARCO определяют в образце с помощью метода, выбранного из группы, состоящей из FACS, вестерн-блоттинга, ИФА, иммунопреципитации, иммуногистохимии, моноплексной иммуногистохимии, мультиплексной иммуногистохимии, иммунофлуоресценции, радиоиммуноанализа, дот-блоттинга, методов иммунодетекции, ВЭЖХ, поверхностного плазмонного резонанса, оптической спектроскопии, масс-спектрометрии, кПЦР, ОТ-кПЦР, мультиплексной кПЦР или ОТ-кПЦР, секвенирования РНК, микроматричного анализа, серийного анализа геной экспрессии, метода MassARRAY, Luminex, MSD и флуоресцентной гибридизации *in situ* и их комбинации.

[0522] В некоторых аспектах в данном документе предложены способы определения уровня экспрессии белка MARCO в образце от субъекта, включающие приведение образца в контакт с антителом к MARCO и проведение иммуногистохимического анализа. В некоторых вариантах осуществления антитело включает RDM5, RDM9, PI-3010.15, PI-3010.25, или PI-3030.41.

[0523] В вариантах осуществления, описанных в данном документе для обнаружения и/или количественного определения, антитело к MARCO связывается с белком MARCO, но не обязательно должно влиять на биологический ответ, такой как АЗКЦ, хотя оно может оказывать влияние на биологический ответ. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с растворимым MARCO.

[0524] В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложены способы идентификации индивида, который может ответить на иммунотерапию (например, антителом к MARCO) для лечения связанного с иммунной системой патологического состояния (например, рака), включающий: определение уровня экспрессии MARCO в биологическом образце, полученном от человека; и определение на основании уровня экспрессии MARCO, может ли индивид ответить на иммунотерапию, где повышенный

уровень MARCO у индивида по сравнению с уровнем у здорового индивида указывает на то, что индивид может ответить на иммунотерапию. В некоторых вариантах осуществления экспрессия MARCO у индивида уже определена. В некоторых вариантах осуществления эти способы также могут быть использованы для диагностики связанного с иммунной системой патологического состояния (например, рака) у индивида и основаны на уровне экспрессии MARCO, где повышенный уровень MARCO у индивида по сравнению с таковым у здорового индивида указывает на то, что индивид страдает от рака. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии MARCO включает уровень экспрессии мРНК MARCO. В других вариантах осуществления уровень экспрессии MARCO включает уровень экспрессии белка MARCO. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии MARCO определяют в образце с помощью анализа нуклеиновых кислот или белков. Примеры анализов нуклеиновых кислот или белков включают, но не ограничиваются ими, FACS, вестерн-блоттинг, ИФА, иммунопреципитацию, иммуногистохимию, моноплексную иммуногистохимию, мультиплексную иммуногистохимию, иммунофлуоресценцию, радиоиммуноанализ, дот-блоттинг, методы иммунодетекции, ВЭЖХ, поверхностный плазмонный резонанс, оптическую спектроскопию, масс-спектрометрию, кПЦР, ОТ-кПЦР, мультиплексную кПЦР или ОТ-кПЦР, секвенирование РНК, микроматричный анализ, серийный анализ экспрессии генов, метод MassARRAY, Luminex, MSD и флуоресцентную гибридизацию *in situ* и их комбинации. В этих вариантах осуществления антитело к MARCO связывается с белком MARCO, но не обязательно должно вызывать биологический ответ, такой как АЗКЦ. В некоторых вариантах осуществления биологический образец получен из опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления биологический образец включает, но не ограничивается этим, жидкость организма, образец ткани, образец органа, мочу, кал, кровь, слюну, спинномозговую жидкость и любую их комбинацию.

[0525] В некоторых вариантах осуществления анализ представляет собой иммуногистохимический анализ, и антитело включает RDM5, RDM9, PI-3010.15, PI-3010.25 или PI-3030.41.

Способ введения

[0526] В некоторых вариантах осуществления антитело к MARCO вводят внутривенно, внутримышечно, подкожно, местно, перорально, трансдермально, интраперитонеально, интраорбитально, путем имплантации, путем ингаляции, интратекально, интравентрикулярно или интраназально. Эффективное количество антитела к MARCO можно вводить для лечения рака. Подходящая доза антитела к MARCO может быть определена на основании типа рака, подлежащего лечению, типа антитела к MARCO, степени тяжести и течения рака, клинического состояния человека, истории болезни и ответа человека на лечение, а также по усмотрению лечащего врача.

Способ получения

[0527] Антитела, описанные в данном документе, могут быть получены с использованием рекомбинантных методов и композиций, например, как описано в патенте США № 4816567.

[0528] В одном варианте осуществления представлена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, описанное в данном документе. Такая нуклеиновая кислота может кодировать аминокислотную последовательность, содержащую VL, и/или аминокислотную последовательность, содержащую VH антитела (например, легкую и/или тяжелую цепи антитела), или аминокислотную последовательность, содержащую VHH однодоменного антитела. В дополнительном варианте реализации предложен один или более векторов (например, векторов экспрессии), содержащих такую нуклеиновую кислоту. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота представлена в мультицистронном векторе. В дополнительном варианте осуществления предложена клетка-хозяин, содержащая такую нуклеиновую кислоту. В одном из таких вариантов осуществления клетка-хозяин содержит (например, трансформирована): (1) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антитела, и аминокислотную последовательность, содержащую VH антигенсвязывающей полипептидной конструкции, или (2) первый вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VL антигенсвязывающей полипептидной конструкции, и второй вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует аминокислотную последовательность, содержащую VH антигенсвязывающей полипептидной конструкции. В одном варианте осуществления клетка-хозяин является эукариотической, например, клеткой яичника китайского хомяка (CHO) или эмбриональной клеткой почки человека (HEK), или лимфоидной клеткой (например, клеткой Y0, NS0, Sp20). В одном варианте осуществления предложен способ получения антитела, причем способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующей антитело, указанную выше, в условиях, подходящих для экспрессии антитела, и, в некоторых случаях, выделение антитела из клетки-хозяина (или из среды для культивирования клетки-хозяина).

[0529] Для получения рекомбинантного антитела нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, например, как описано выше, выделяют и вставляют в один или более векторов для дальнейшего клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Такая нуклеиновая кислота может быть легко выделена и секвенирована с использованием общепринятых способов (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, которые кодируют тяжелые и легкие цепи антитела).

[0530] Термин «существенно очищенный» относится к конструкции, описанной в данном документе, или ее варианту, который может быть по существу или практически свободен от компонентов, которые, как правило, сопровождают или взаимодействуют с белком в его естественном окружении, т.е. нативная клетка или клетка-хозяин в случае

рекомбинантно полученного гетеромультимера, которая в определенных вариантах осуществления по существу свободен от клеточного материала, включает препараты белка, имеющие менее около 30%, менее около 25%, менее около 20%, менее около 15%, менее около 10%, менее около 5%, менее около 4%, менее около 3%, менее около 2% или менее около 1% (по сухой массе) загрязняющего белка. Если гетеромультимер или его вариант рекомбинантно продуцируется клетками-хозяевами, то в некоторых вариантах осуществления белок составляет около 30%, около 25%, около 20%, около 15%, около 10%, около 5%, около 4%, около 3%, около 2%, или около 1% или меньше сухой массы клеток. Если гетеромультимер или его вариант рекомбинантно продуцируется клетками-хозяевами, то в определенных вариантах осуществления белок присутствует в культуральной среде в количестве около 5 г/л, около 4 г/л, около 3 г/л, около 2 г/л, около 1 г/л, около 750 мг/л, около 500 мг/л, около 250 мг/л, около 100 мг/л, около 50 мг/л, около 10 мг/л или около 1 мг/л или менее от сухой массы клеток. В определенных вариантах осуществления «существенно очищенный» гетеромультимер, полученный описанными в данном документе методами, имеет уровень чистоты по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, конкретно, уровень чистоты по меньшей мере около 75%, 80%, 85%, и более конкретно, уровень чистоты по меньшей мере около 90%, уровень чистоты по меньшей мере около 95%, уровень чистоты по меньшей мере около 99% или выше, при определении соответствующими методами, такими как анализ методом ДСН/ПААГ-электрофореза, ОФ-ВЭЖХ, ЭХ и капиллярный электрофорез.

[0531] Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, включают прокариотические или эукариотические клетки, описанные в данном документе.

[0532] Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» или «клетка-хозяин» относится к клетке, которая включает экзогенный полинуклеотид, независимо от примененного для вставки метода, например, прямое поглощение, трансдукция, половой процесс с f-плазмидами или другие методы, известные в данной области техники для создания рекомбинантных клеток-хозяев. Экзогенный полинуклеотид может поддерживаться в виде неинтегрированного вектора, например плазмиды, или альтернативно может интегрироваться в геном хозяина. Клетки-хозяева могут включать СНО, производные СНО, NS0, Sp2O, CV-1, VERO-76, HeLa, HepG2, Per.C6, или ВНК.

[0533] В контексте данного документа термин «эукариот» относится к организмам, принадлежащим к филогенетическому домену Eucarya, таким как животные (включая, помимо прочего, млекопитающих, насекомых, рептилий, птиц и т. д.), инфузории, растения (включая, но не ограничиваясь ими, однодольные, двудольные, водоросли и др.), грибы, дрожжи, жгутиконосцы, микроспоридии, протисты и др.

[0534] В контексте данного документа термин «прокариот» относится к прокариотическим организмам. Например, неэукариотический организм может принадлежать филогенетическому домену Eubacteria (включая, но ограничиваясь *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, и т. п.) или филогенетическому домену Archaea (включая, но ограничиваясь, *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, такой как *Haloferax volcanii* и *Halobacterium species NRC-1*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeuryrum pernix*, и т. п.).

[0535] Например, антитело может продуцироваться в бактериях, в частности, когда гликозилирование и эффекторная функция Fc не нужны. Для экспрессии фрагментов антител и полипептидов в бактериях см., например, патенты США № 5648237, 5789199 и 5840523. (См. также Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254, описывающую экспрессию фрагментов антител в *E. coli*). После экспрессии антитело может быть выделено из биомассы бактериальных клеток в растворимой фракции и может быть дополнительно очищено.

[0536] Помимо прокариот, подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих антитела, являются эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, чьи метаболические пути гликозилирования были «гуманизированы», что приводит к продукции антител с частично или полностью человеческим профилем гликозилирования. См. Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004), и Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006).

[0537] Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированных антител также получены из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных). Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы, которые можно использовать в комбинации с клетками насекомых, в частности для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

[0538] В качестве хозяев также можно использовать культуры растительных клеток. См., например, патент США №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описывающих технологию PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях).

[0539] Клетки позвоночных могут также использоваться в качестве хозяев. Например, могут быть подходящими клеточные линии млекопитающих, которые приспособлены для роста в суспензии. Другими примерами полезных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия почки обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7); линия эмбриональных почек человека (клетки 293 или 293, как описано, например, в Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (ВНК); клетки почки новорожденного хомяка (клетки TM4, описанные, например, в Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки

африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK; клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, как описано, например, в Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982); клетки MRC 5; и клетки FS4. Другие полезные линии клеток-хозяев млекопитающих включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая клетки DHFR-CHO (Urlaub et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); и линии клеток миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Для обзора некоторых линий клеток-хозяев млекопитающих, подходящих для продукции антител, см., например, Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003).

[0540] В одном варианте осуществления описанные в данном документе антитела продуцируются в стабильных клетках млекопитающих способом, включающим: трансфекцию по меньшей мере одной стабильной клетки млекопитающего: нуклеиновой кислотой, кодирующей антитело, в заранее определенном соотношении; и экспрессию нуклеиновой кислоты по меньшей мере в одной клетке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления предварительно заданное соотношение нуклеиновой кислоты определяют в экспериментах по транзientной трансфекции для определения относительного соотношения входящих нуклеиновых кислот, которое приводит к наибольшему процентному содержанию антитела в экспрессированном продукте.

[0541] В некоторых вариантах осуществления представлен способ получения антитела в стабильных клетках млекопитающих, как описано в данном документе, причем продукт экспрессии по меньшей мере одной стабильной клетки млекопитающего содержит больший процент желаемого гликозилированного антитела по сравнению с мономерными полипептидами тяжелой или легкой цепи, или других антител.

[0542] В некоторых вариантах осуществления описан способ получения гликозилированного антитела в стабильных клетках млекопитающих, причем указанный способ включает идентификацию и очистку желаемого гликозилированного антитела. В некоторых вариантах осуществления указанную идентификацию выполняют одним или обоими методами жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии.

[0543] При необходимости антитела можно очистить или выделить после экспрессии. Белки можно выделять или очищать различными способами, известными специалистам в данной области техники. Стандартные методы очистки включают хроматографические методики, включая ионный обмен, гидрофобное взаимодействие, аффинность, разделение по размерам или гель-фильтрацию и обращение фаз, выполняемые при атмосферном давлении или при высоком давлении с использованием таких систем, как ЖХБР и ВЭЖХ. Методы очистки также включают электрофоретические, иммунологические методики, методики осаждения, диализа и хроматофокусирования. Применимы также методики ультрафильтрации и диафильтрации в сочетании с концентрированием белков. Как хорошо известно в данной области

техники, множество природных белков связывают Fc и антитела, и эти белки могут найти применение в данном изобретении для очистки антител. Например, бактериальные белки A и G связываются с Fc-областью. Аналогичным образом бактериальный белок L связывается с областью Fab некоторых антител. Очистка часто становится возможной с помощью конкретного партнера по слиянию. Например, антитела можно очищать, используя смолу с глутатионом, если применяется GST-гибридизация, аффинную хроматографию с Ni²⁺, если применяется His-метка, или иммобилизованное антитело к flag, если применяется flag-метка. Общие рекомендации по подходящим методам очистки см., например, Protein Purification: Principles and Practice, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994, которая полностью включена посредством ссылки. Необходимая степень очистки будет варьироваться в зависимости от применения антител. В некоторых случаях очистка не требуется.

[0544] В некоторых вариантах осуществления антитела очищают с помощью анионообменной хроматографии, включая, но не ограничиваясь этим, хроматографию на колонках с Q-сефарозой, DEAE-сефарозой, порос HQ, порос DEAF, Toyopearl Q, Toyopearl QAE, Toyopearl DEAE, Resource/Source Q и DEAE, Fractogel Q и DEAE.

[0545] В конкретных вариантах осуществления описанные в данном документе белки очищают с помощью катионообменной хроматографии, включая, но не ограничиваясь этим, хроматографию на колонках с SP-сефарозой, CM-сефарозой, порос HS, порос CM, Toyopearl SP, Toyopearl CM, Resource/Source S и CM, Fractogel S и CM, и их эквиваленты и аналоги.

[0546] Кроме того, описанные в данном документе антитела могут быть химически синтезированы с использованием методов, известных в данной области техники (например, см. Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N.Y and Hunkapiller et al., Nature, 310:105-111 (1984)). Например, полипептид, соответствующий фрагменту полипептида, можно синтезировать применяя пептидный синтез. Кроме того, при желании, в полипептидную последовательность в качестве замены или добавления можно вводить неклассические аминокислоты или химические аналоги аминокислот. Неклассические аминокислоты включают, но не ограничиваются ими, D-изомеры обычных аминокислот, 2,4-диаминомасляную кислоту, альфа-аминоизомасляную кислоту, 4-аминомасляную кислоту, Abu, 2-аминомасляную кислоту, g-Abu, e-Ahx, 6-аминогексановую кислоту, Aib, 2-аминоизомасляную кислоту, 3-аминопропионовую кислоту, орнитин, норлейцин, норвалин, гидроксипролин, саркозин, цитруллин, гомоцитруллин, цистеиновую кислоту, т-бутилглицин, т-бутилаланин, фенилглицин, циклогексилаланин, аланин, фтораминокислоты, сконструированные аминокислоты, такие как α -метиламинокислоты, C-метиламинокислоты, N-метиламинокислоты и в целом аналоги аминокислот. Кроме того, аминокислота может быть D (правовращающей) или L (левовращающей).

Фармацевтические композиции

[0547] Способы лечения иммунозависимых заболеваний (например, рака) также охватываются настоящим изобретением. Указанные способы по изобретению включают введение терапевтически эффективного количества антитела к MARCO или его антигенсвязывающего фрагмента. Антитело к MARCO или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть включены в состав фармацевтических композиций. Эти композиции могут содержать в дополнение к одному или более антителам к MARCO или их антигенсвязывающим фрагментам фармацевтически приемлемый эксципиент, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Точная природа носителя или другого материала может зависеть от способа введения, например, пероральный, внутривенный, кожный или подкожный, назальный, внутримышечный, внутривентрикулярный пути.

[0548] Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть в форме таблеток, капсул, порошка или жидкости. Таблетка может содержать твердый носитель, такой как желатин или адьювант. Жидкие фармацевтические композиции, как правило, содержат жидкий носитель, такой как вода, нефть, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть включены физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

[0549] Для внутривенной, кожной или подкожной инъекции или инъекции в место поражения активный ингредиент будет в форме парентерально приемлемого водного раствора, имеющего подходящие рН, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области техники могут хорошо приготовить подходящие растворы, используя, например, изотонические носители, такие как хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, лактатный раствор Рингера для инъекций. При необходимости могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

[0550] Будь то полипептид, антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или другое фармацевтически полезное соединение по настоящему изобретению, которое следует вводить индивиду, введение предпочтительно осуществляется в «терапевтически эффективном количестве» или «профилактически эффективном количестве» (в зависимости от обстоятельств, хотя профилактика может считаться терапией), что является достаточным для оказания пользы индивиду. Фактическое количество вводимого препарата, а также скорость и время введения будут зависеть от характера и степени тяжести заболевания, связанного с агрегацией белков, которое лечат. Назначение лечения, например, принятие решений о дозировке и т.д. входит в обязанности врачей общей практики и других врачей, и, как правило, учитывает нарушение, подлежащее лечению, состояние конкретного пациента, место доставки, способ применения и другие факторы, известные практикующим врачам. Примеры вышеупомянутых техник и протоколов можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed), 1980.

[0551] Композиция может назначаться отдельно или в комбинации с другими видами лечения, одновременно или последовательно, в зависимости от патологического состояния, подлежащего лечению.

Наборы и промышленные изделия

[0552] В настоящей заявке представлены наборы, содержащие любую одну или более композиций антител, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно содержат компонент, выбранный из любого из вторичных антител, реагентов для иммуногистохимического анализа, фармацевтически приемлемого эксципиента и инструкции по применению, а также любой их комбинации. В одном конкретном осуществлении набор содержит фармацевтическую композицию, содержащую любую одну или более композиций антител, описанных в данном документе, с одним или более фармацевтически приемлемыми эксципиентами.

[0553] В настоящей заявке также представлены промышленные изделия, содержащие любую из композиций антител или наборов, описанных в данном документе. Примеры изделий включают флаконы (в том числе герметичные флаконы).

Дополнительные варианты осуществления

[0554] В одном аспекте в данном документе предложены выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с человеческим рецептором макрофагов с коллагеновой структурой (MARCO) (SEQ ID NO: 384) и конкурируют за связывание с эталонным антителом, при этом эталонное антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где:

CDR-H1 включает последовательность GFSLTSYHVS (SEQ ID NO: 2),

CDR-H2 включает последовательность AIWTGGSIA (SEQ ID NO: 3),

CDR-H3 включает последовательность DLSDYYSSYTSFDY (SEQ ID NO: 4),

CDR-L1 включает последовательность ASEGISNDLA (SEQ ID NO: 431) или XASEGISNDLA (SEQ ID NO: 383), где X представляет собой аргинин (R) или лейцин (L),

CDR-L2 включает последовательность AASRLQD (SEQ ID NO: 8), и

CDR-L3 включает последовательность QQSYKYPLT (SEQ ID NO: 9).

[0555] В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность ASEGISNDLA (SEQ ID NO: 431).

[0556] В некоторых вариантах осуществления CDR-L1 включает последовательность RASEGISNDLA (SEQ ID NO: 27).

[0557] В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 61; и последовательность VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 66.

[0558] В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 111; и последовательность VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 116.

[0559] В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 434, 444, или 474.

[0560] В некоторых вариантах осуществления последовательность VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 57, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 439, 449, или 479.

[0561] В некоторых вариантах осуществления последовательность VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 434, 444, или 474; и последовательность VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 57, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 439, 449, или 479.

[0562] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 65; и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 70.

[0563] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 115; и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 120.

[0564] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 5, 15, 125, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 145, 438, 448, и 478, и последовательность легкой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 6, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 443, 453 и 483.

[0565] В некоторых вариантах осуществления последовательность VH состоит из последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 61; и последовательность VL состоит из последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 66.

[0566] В некоторых вариантах осуществления последовательность VH состоит из последовательности VH, указанной в SEQ ID NO: 111; и последовательность VL состоит из последовательности VL, указанной в SEQ ID NO: 116.

[0567] В некоторых вариантах осуществления последовательность VH состоит из последовательности VH, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 434, 444, или 474; и последовательность VL состоит из последовательности VL, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 57, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 439, 449, или 479.

[0568] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом последовательность тяжелой цепи состоит из последовательности тяжелой цепи, указанной в SEQ ID NO: 65, а последовательность легкой цепи состоит из последовательности легкой цепи, указанной в SEQ ID NO: 70.

[0569] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом последовательность тяжелой цепи состоит из последовательности тяжелой цепи, указанной в SEQ ID NO: 115, а последовательность легкой цепи состоит из последовательности легкой цепи, указанной в SEQ ID NO: 120.

[0570] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область Fc человека.

[0571] В некоторых вариантах осуществления область Fc человека представляет собой Fc человеческого IgG1 дикого типа.

[0572] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит Fc человеческого IgG1 дикого типа, и при этом последовательность VH содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 61, а последовательность VL содержит последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 66.

[0573] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит Fc человеческого IgG1 дикого типа, и при этом последовательность VH содержит последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 111, и последовательность VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 116.

[0574] В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с MARCO человека с KD менее или равной около 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, или 7×10^{-9} M, по данным анализа методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

[0575] В некоторых вариантах осуществления антитело гуманизировано.

[0576] В одном аспекте в данном документе предложены способы получения антитела, включающие экспрессию описанного в данном документе антитела из клетки-хозяина и выделение экспрессированного антитела.

[0577] В одном аспекте в данном документе предложены фармацевтические композиции, содержащие антитело, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0578] В одном аспекте в данном документе предложены наборы, содержащие антитело, как описано в данном документе, и инструкции по применению.

[0579] В одном аспекте в данном документе предложены выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с MARCO человека (SEQ ID NO: 384) и конкурируют за связывание с эталонным антителом, при этом эталонное антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где:

CDR-H1 включает последовательность GYTFTDYAVN (SEQ ID NO: 232),

CDR-H2 включает последовательность WINTQTGKPT (SEQ ID NO: 233),

CDR-H3 включает последовательность DSYYYSSSLDY (SEQ ID NO: 234),

CDR-L1 включает последовательность ASAGISNDLA (SEQ ID NO: 432) или XASAGISNDLA (SEQ ID NO: 381), где X представляет собой аргинин (R) или лейцин (L),

CDR-L2 включает последовательность AASRLQD (SEQ ID NO: 238), и
CDR-L3 включает последовательность QQSYKYPWT (SEQ ID NO: 239).

[0580] В одном аспекте в данном документе предложены способы лечения рака у субъекта, включающие введение субъекту антитела, которое конкурирует за связывание с MARCO человека (SEQ ID NO: 384) с эталонным антителом, при этом эталонное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и легкую цепь, содержащую последовательность варибельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где:

CDR-H1 включает последовательность GFSLTSYHVS (SEQ ID NO: 2),

CDR-H2 включает последовательность AIWTGGSIA (SEQ ID NO: 3),

CDR-H3 включает последовательность DLSDYYSSYTSTFDY (SEQ ID NO: 4),

CDR-L1 включает последовательность ASEGISNDLA (SEQ ID NO: 431) или XASEGISNDLA (SEQ ID NO: 383), где X представляет собой аргинин (R) или лейцин (L),

CDR-L2 включает последовательность AASRLQD (SEQ ID NO: 8), и

CDR-L3 включает последовательность QQSYKYPLT (SEQ ID NO: 9).

[0581] В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал, получает или будет получать иммунотерапию, где иммунотерапия включает по меньшей мере одно из: ингибитора контрольной точки; ингибитора контрольной точки Т-клеток; антитела к PD1; антитела к PDL1; антитела к CTLA4; адаптивной Т-клеточной терапии; CAR-Т-клеточной терапии; вакцины на основе дендритных клеток; моноцитарной вакцины; антигенсвязывающего белка, который связывает как Т-клетку, так и антигенпрезентирующую клетку; двойного антигенсвязывающего белка BiTE; лиганда Toll-подобного рецептора; цитокина; цитотоксической терапии; химиотерапии; лучевой терапии; низкомолекулярного ингибитора; низкомолекулярного агониста; иммуномодулятора; и эпигенетического модулятора.

[0582] В некоторых вариантах осуществления иммунотерапия включает в себя антитело к PD1, антитело к PDL1 или антитело к CTLA4.

[0583] В одном аспекте в данном документе предложены способы усиления иммунного ответа у субъекта, включающие введение субъекту антитела, которое конкурирует за связывание с MARCO человека (SEQ ID NO: 384) с эталонным антителом, причем эталонное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и легкую цепь, содержащую последовательность варибельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где:

CDR-H1 включает последовательность GFSLTSYHVS (SEQ ID NO: 2),

CDR-H2 включает последовательность AIWTGGSIA (SEQ ID NO: 3),

CDR-H3 включает последовательность DLSDYYSSYTSTFDY (SEQ ID NO: 4),

CDR-L1 включает последовательность ASEGISNDLA (SEQ ID NO: 431) или XASEGISNDLA (SEQ ID NO: 383), где X представляет собой аргинин (R) или лейцин (L), CDR-L2 включает последовательность AASRLQD (SEQ ID NO: 8), и CDR-L3 включает последовательность QQSYKYPLT (SEQ ID NO: 9).

ПРИМЕРЫ

[0584] Ниже приведены примеры конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения. Примеры являются исключительно иллюстративными и никоим образом не подразумевают ограничения объема данного изобретения. Были приняты меры для того, чтобы сохранить точность в отношении используемых чисел (например, количеств, значений температуры и т. д.), однако следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения.

[0585] В практике по настоящему изобретению будут использоваться, если не указано иное, стандартные методы химии белков, биохимии белков, методы рекомбинантной ДНК и фармакологии, доступные специалистам в данной области техники. Такие методы подробно описаны в литературе. См., например, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B(1992).

Пример 1: MARCO экспрессируется в опухолях нескольких типов

[0586] Экспрессия РНК MARCO в общей массе ткани при множественных типах рака

[0587] Экспрессия мРНК MARCO в опухолевых и нормальных тканях по всем патологиям в Атласе ракового генома (TCGA) была создана с помощью инструмента для визуализации и анализа данных экспрессии генов от института БРОДА по адресу firebrowse.org.

[0588] Упорядоченная экспрессия мРНК MARCO в опухолевой ткани (левая полоса) по сравнению с нормальной тканью (правая полоса) показана на **Фиг. 1**. По оси абсцисс перечислены следующие типы опухолей: ACC, аденокортикальная карцинома; BLCA, уротелиальная карцинома мочевого пузыря; BRCA, инвазивная карцинома молочной железы; CESC, плоскоклеточная карцинома шейки матки и эндоцервикальная аденокарцинома; CHOL, холангиокарцинома; COAD, аденокарцинома толстой кишки; COADREAD, аденокарцинома толстой кишки и аденокарцинома прямой кишки; DLBC, диффузная В-крупноклеточная лимфома; ESCA, карцинома пищевода; GBM, мультиформная глиобластома; GBMLGG, мультиформная глиобластома и глиома более низкой степени злокачественности; HNSC, плоскоклеточная карцинома головы и шеи; KICH, хромофобная почечно-клеточная карцинома; KIRC, светлоклеточная почечно-клеточная карцинома; KIRP, почечная папиллярно-клеточная карцинома; KIPAN, общая

когорта почечных карцином (KICH+KIRC+KIRP); LAML, острый миелоидный лейкоз; LGG, глиома головного мозга более низкой степени злокачественности; LIHC, гепатоцеллюлярная карцинома печени; LUAD, аденокарцинома легкого; LUSC, плоскоклеточная карцинома легкого; MESO, мезотелиома; OV, серозная цистаденокарцинома яичника; PAAD, аденокарцинома поджелудочной железы; PCPG, феохромоцитомы и параганглиомы; PRAD, аденокарцинома предстательной железы; READ, аденокарцинома прямой кишки; SARC, саркома; SKCM, меланома кожи; STAD, аденокарцинома желудка; STES, рак желудка и пищевода; TGCT, герминогенные опухоли яичка; THYM, тимома; THCA, карцинома щитовидной железы; UCS, карциносаркома матки; UCEC, рак эндометрия тела матки; UVM, увеальная меланома. Ось ординат представляет преобразованные \log_2 значения представленности транскриптов из данных секвенирования РНК, количественно оцененные с использованием секвенирования РНК путем максимизации ожидания (RSEM).

[0589] Экспрессия MARCO в первичных опухолях с помощью секвенирование РНК одиночных клеток (scRNA-Seq)

[0590] Секвенирование РНК одиночных клеток (scRNA-Seq)

[0591] 1 мл замороженных диссоциированных опухолевых клеток из различных опухолей был приобретен у Discovery Life Sciences. Замороженный осадок оттаивали на водяной бане при 37°C и постепенно разбавляли 25 мл теплой RPMI, содержащей 10% FBS и 10 mM HEPES, и центрифугировали в течение 5 мин при 550 gcf. Клеточный осадок окрашивали анти-CD45-PE (клон HI30, Biolegend). DAPI, CD45⁺ клетки сортировали на BD FACSAria Fusion. После сортировки клетки трижды промывали 3 мл 0,04% BSA/PBS и ресуспендировали в концентрации 5×10^5 клеток/мл. Клетки загружали в Chromium Chip B для целенаправленной инкапсуляции 10000 клеток и помещали в Chromium Controller (10X Genomics, набор реагентов Single Cell 3' v3). Очистку после GEM-RT, амплификацию кДНК и создание библиотеки выполняли в соответствии с руководством пользователя Single Cell 3' v3 от 10X Genomics. Библиотеки секвенировали на NovaSeq от MedGenome Inc.

[0592] Обработка данных одиночных клеток

[0593] Данные секвенирования обрабатывали с использованием программного пакета Cell Ranger v3.0.2 от 10X Genomics. MedGenome Inc. предоставила файлы fastq для каждого образца путем преобразования необработанных файлов bcl Illumina в файлы fastq с помощью подпрограммы mkfastq из пакета Cell Ranger. После этого был проведен подсчет Cell Ranger, в котором используется STAR (Dobin et al., 2013) для сопоставления прочтений с эталонным человеческим геномом GRCh38. После фильтрации прочтений с избыточными уникальными молекулярными идентификаторами (UMI) с помощью count генерировали файлы гено-клеточных баркодов (папка filtered_feature_bc_matrix, состоящая из barcodes.tsv, features.tsv и matrix.mtx). И mkfastq, и count запускали с параметрами по умолчанию.

[0594] Идентификация, кластеризация и визуализация клеток

[0595] Для каждого образца файлы `filtered_feature_bc_matrix` отправляли в программный пакет R (v. 3.6.0) Seurat (Satija et al., 2015) (<https://satijalab.org/seurat>) (v2.3.4) для всех последующих анализов. Файл `features.tsv` переименовали в `genes.tsv` для обеспечения совместимости с функцией `Read10X`. Данные были отфильтрованы для клеток, которые экспрессировали как минимум 200 генов, все гены были экспрессированы по меньшей мере в 3 клетках и имели не более 8500 UMI. Клетки, содержащие >20% прочтений, связанных с митохондриальными генами, и >45% прочтений, связанных с рибосомными генами, удаляли. Затем данные подсчета были логарифмически преобразованы и масштабированы с использованием количества UMI каждой оставшейся клетки и доли митохондриальных и рибосомных генов в качестве нежелательных факторов (реализованных в функции `ScaleData` из Seurat) для коррекции любых оставшихся нежелательных эффектов при последующих анализах кластеризации и дифференциальной экспрессии. Для каждого образца был проведен анализ главных компонент (PC) для набора сильно варьируемых генов, определенных функцией `FindVariableGenes` из Seurat. Гены, ассоциированные с получившимися PC с наибольшими значениями (выбранными путем визуальной оценки графика каменистой осыпи), затем использовались для идентификации кластера на основе графа и последующего уменьшения размерности с использованием метода нелинейного снижения размерности и визуализации многомерных переменных (tSNE). Идентификацию маркеров на основе кластеров и определение дифференциальной экспрессии выполняли с использованием `FindAllMarkers` из Seurat для всех межкластерных сравнений. Графики строили с использованием встроенных в Seurat функций визуализации (`TSNEPlot`, `FeaturePlot`).

[0596] MARCO преимущественно экспрессируется в опухолевых моноцитах и макрофагах человека, как определено анализом методом scRNA-Seq (данные не показаны). Для опухолевых клеток от рака легкого, рака почки (RCC), рака яичников, колоректального рака и рака головы и шеи показана экспрессия MARCO на моноцитах и макрофагах.

[0597] Экспрессию РНК MARCO индуцируют с помощью IL-10

[0598] Дифференцированные макрофаги человека поляризовали добавлением в среду следующих цитокинов на 24 часа при 37C: 50 нг/мл липополисахарида (ЛПС) (InvivoGen), 25 нг/мл рекомбинантного человеческого IFN- γ (PeproTech), ЛПС+ IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β , TGF- β +, или IL-10. Затем среду удаляли и макрофаги лизировали в 300 мкл буфера RLT+BME с последующей экстракцией РНК с использованием набора Qiagen. Количество и качество мРНК оценивали с помощью Nanodrop и Agilent Bioanalyzer перед отправкой образцов в Medgenome для подготовки библиотеки и секвенирования РНК. Затем экспрессию мРНК MARCO для каждого из условий поляризации получали из анализа секвенирования РНК и наносили на график в единицах \log_2 CPM.

[0599] Как показано на **Фиг. 2**, экспрессию РНК MARCO индуцировали IL-10 в моноцитарных макрофагах (MDM)

[0600] Экспрессия IL10 и MARCO коррелирует между патологиями

[0601] Все данные секвенирования РНК уровня 2 по одной патологии из TCGA были загружены из Института Брода с использованием `firehose_get`. Значения RSEM для экспрессии MARCO, IL-10, PTPRC (CD45) и TREM2 в образцах опухолей были преобразованы в \log_2 количества на миллион прочтений. По каждой патологии были рассчитаны медианные значения экспрессии MARCO и IL10 в R. Размер точки определяли по степени ранговой корреляции Спирмена для IL10-MARCO. Матрица медианных значений экспрессии генов, перечисленных выше, по каждой патологии была преобразована в матрицу корреляций Спирмена и построена в виде тепловой карты с использованием пакета `rheatmap` в R.

[0602] На **Фиг. 3А** показана корреляция экспрессии MARCO и IL-10 в различных типах опухолей, а на **Фиг. 3В** показана тепловая карта корреляции между экспрессией TREM2, экспрессией CD45, экспрессией IL-10 и экспрессией MARCO. Как показано на **Фиг. 3А** и **3В**, экспрессия IL10 и MARCO хорошо коррелирует между патологиями рака.

[0603] Экспрессия MARCO и корреляция с выживаемостью пациентов при различных патологиях

[0604] При колоректальном раке (CRC)

[0605] Предварительно нормализованные профили экспрессии MARCO и соответствующие клинические данные по 55 опухолям толстой кишки были загружены с сайта GEO от NCBI (№ доступа: GSE17537). Профили экспрессии были разделены на две когорты на основе медианного уровня MARCO. Для каждой когорты были построены кривые выживаемости Каплана-Мейера и проведен соответствующий логранговый тест с использованием пакетов `survival` и `survminer` в R. Как показано на **Фиг. 4А**, экспрессия MARCO обратно коррелирует с вероятностью выживания пациента при CRC; более высокая экспрессия MARCO коррелировала с более низкой вероятностью выживания пациента, а более низкая экспрессия MARCO коррелировала с более высокой вероятностью выживания пациента.

[0606] При почечно-клеточной карциноме (RCC)

[0607] Ассоциации выживаемости двух когорт рака почки (почечно-клеточная карцинома) из TCGA на основе медианного разделения экспрессии мРНК MARCO, полученного с помощью веб-инструмента «Gene Expression Profiling Interactive Analysis» (GEPIA2) по веб-адресу: <http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>.

[0608] Как показано на **Фиг. 4В**, экспрессия MARCO обратно коррелирует с вероятностью выживания пациента при RCC; более высокая экспрессия MARCO коррелировала с более низкой вероятностью выживания пациента, а более низкая экспрессия MARCO коррелировала с более высокой вероятностью выживания пациента при RCC.

[0609] При нейробластоме

[0610] Предварительно нормализованные профили экспрессии MARCO и соответствующие клинические данные по 498 нейробластомам были загружены с сайта GEO от NCBI (№ доступа: GSE62564). Профили экспрессии были разделены на две

когорты на основе медианного уровня MARCO. Для каждой когорты были построены кривые выживаемости Каплана-Мейера и проведен соответствующий логранговый тест с использованием пакетов `survival` и `survminer` в R.

[0611] Как показано на **Фиг. 4С**, экспрессия MARCO обратно коррелирует с вероятностью выживания пациента при нейробластоме; более высокая экспрессия MARCO коррелировала с более низкой вероятностью выживания пациента, а более низкая экспрессия MARCO коррелировала с более высокой вероятностью выживания пациента при нейробластоме.

[0612] Предварительно нормализованные профили экспрессии MARCO и соответствующие клинические данные по 394 нейробластомам были загружены с сайта GEO от NCBI (№ доступа: GSE120572). Профили экспрессии MARCO были построены для всех образцов с идентифицированной стадией по системе INSS. Статистические данные для парных сравнений были получены с использованием критерия суммы рангов Уилкоксона в R. Как показано на **Фиг. 4D**, экспрессия MARCO увеличивалась в зависимости от степени тяжести нейробластомы в соответствии со стадией по системе INSS.

[0613] При базальноподобном раке молочной железы

[0614] Экспрессия MARCO из TCGA для подтипа по PAM50 рака молочной железы человека, полученная с помощью веб-инструмента «Gene Expression Profiling Interactive Analysis» (GEPIA2) по веб-адресу: gepia2.cancer-pku.cn/#index. Профили экспрессии METABRIC и связанные с ними клинические данные были загружены с сайта cBioPortal по веб-адресу: cbioportal.org. Нормализованные профили экспрессии MARCO были построены в R для когорт на основе субтипирования PAM50. Статистические данные для парных сравнений были получены с использованием критерия суммы рангов Уилкоксона в R.

[0615] Как показано на **Фиг. 5** показано, что экспрессия MARCO повышается при базальноподобном раке молочной железы по сравнению с другими подтипами рака молочной железы. На левой панели показана экспрессия MARCO из TCGA, на правой панели показана экспрессия MARCO из METABRIC.

[0616] MARCO экспрессируется на высоком уровне в популяции внутриопухолевых промежуточных моноцитов. Профиль генной экспрессии иммунной пустыни и исключения были усилены в MARCO+ кластере. Агрегированные TAM и моноциты, полученные в результате секвенирования отдельных клеток иммунных клеток человека из опухолей мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, эндометрия, желудка, головы и шеи, почек, легкого и яичников, позволили выделить один кластер со значительно повышенной экспрессией MARCO в переходных моноцитах (кластер 2). Анализ представленности групп генов (GSEA) путей ключевых фенотипических признаков (богатый MARCO кластер 2 по сравнению со всеми другими макрофагами и моноцитами) продемонстрировал, что экспрессия MARCO была связана с наборами иммуносупрессивных генов, ассоциированных с матриксом, (например, ангиогенезом,

EMT) и снижена для воспалительных, интерфероновых путей. Значимыми (FDR <0,05) идентифицированными путями, которые активировались в MARCO+ клетках, были гликолиз, окислительное фосфорилирование, эпителиально-мезенхимальный переход, гипоксия, метаболизм ксенобиотиков, ангиогенез, гомеостаз холестерина, адипогенез, метаболизм жирных кислот, путь активных форм кислорода и сигналинг mTORC1. Значимыми (FDR <0,05) идентифицированными путями, которые подавлялись в MARCO+ клетках, были отторжение аллотрансплантата, сигналинг TGF- β , сигналинг KRAS DN, сигналинг TNF α через NF- κ B, ответ IFN γ и ответ IFN α .

Пример 2: Получение и характеристика антител к MARCO человека

[0617] *Гибридомы первого поколения*

[0618] Кампания по получению антител была проведена в Antibody Solutions (Саннивейл, Калифорния) с двумя быстрыми кампаниями на 3 мышах Balb/c каждая и одной стандартной кампанией на 4 мышах Balb/c с использованием His-меченного человеческого внеклеточного домена MARCO (His-ВКД 147-520, используя остатки 147-419 коллаген-подобного домена (CLD) и остатки 424-520 богатого цистеином домена рецептора-мусорщика (SRCR), Pi-114) в качестве иммуногена. Программа быстрой иммунизации состояла из 10 инъекций 2 раза в неделю с введением в подушечки стопы. Стандартная программа иммунизации состояла из 5 инъекций в течение 12 недель с подкожным введением. Кампания Rapid 1 включала TLR+анти-CTLA4 для адьювантов, тогда как кампания Rapid 2 включала TLR+анти-GITR. Сыворотку мыши тестировали в различные моменты времени на титр антигена с помощью ИФА. Селезенку и лимфатические узлы мыши из кампании Rapid 1 с наивысшим титром сливали и создавали гибридную библиотеку для получения иммортализованной популяции клеток, продуцирующих антитела, представляющих популяцию стимулированных В-клеток, отвечающих на антиген. Клонирование отдельных клеток с помощью сортировки методом FACS выполняли для создания гибридом одиночных клонов для культур, продуцирующих моноклональные антитела. Затем 2880 клонов подвергали скринингу с помощью двойной проточной цитометрии на связывание со сверхэкспрессирующими MARCO линиями клеток 293Т мыши и человека и с использованием экспрессирующей GFP линии клеток, (GFP-293Т), в качестве отрицательного контроля в отношении отсутствия связывания. 33 клон были идентифицированы при первичном скрининге с перекрестной реактивностью как к человеческому, так и к мышинному MARCO и с нулевым или низким фоновым связыванием, и были дополнительно проверены с помощью ИФА на человеческий антиген Pi-114 MARCO. Супернатанты гибридом из 33 клонов проверяли на связывание клеток с помощью проточной цитометрии.

[0619] *Создание стабильно сверхэкспрессирующих линий клеток*

[0620] Последовательности ДНК MARCO мыши и человека были клонированы в лентивирусный вектор pLenti-GIII-CMV-GFP-2A-Puro в Abmgood (Ванкувер, Канада) и амплифицированы с использованием стандартных протоколов бактериальной трансформации с использованием штаммов E.coli DH5-альфа для достижения высоких

выходов плазмиды для лентивирусной упаковки. Вирусные частицы из пустого контрольного вектора GFP, клонированных лентивирусных векторов MARCO человека и MARCO мыши получали и упаковывали в клетки 293T и концентрировали для получения высоких титров. Клетки 293T использовали в качестве клеток-мишеней для заражения вирусом, предоставленным Abmgood, в соответствии с их протоколами и рекомендациями. Пуромицин использовали для селекции инфицированных пулов, и размножали отдельные клоны, экспрессирующие равномерно высокие уровни MARCO мыши (293T_MuMARCO), MARCO человека (293T_HuMARCO) и GFP (293T_GFP).

[0621] Затем был создан лентивирусный остов pD2109-CMV-пуромицин для клонирования дополнительных плазмид MARCO без и с IRES-GFP: полноразмерный MARCO человека с GFP (плазида 3012) и без GFP (плазида 3010), полноразмерный MARCO мыши с GFP (плазида 3013) и без GFP (плазида 3011), MARCO яванского макака (MARCO макака) полной длины с GFP (плазида 3021) и без GFP (плазида 3014), только CLD MARCO человека (1-419, плазида 3022) и химерный белок CLD MARCO мыши- SRCR MARCO человека с IRES-GFP (плазида 3020). Клетки 293FT от Sigma трансфицировали указанными выше конструкциями с использованием Fugene для получения лентивирусных частиц и последующей трансдукции клеток 293T. Пуромицин использовали для отбора положительных клонов, которые были размножены для создания следующих стабильных пулов клеток для использования *in vitro*: 3010 (Hu_MARCO), 3012 (Hu_MARCO_GFP), 3011 (Mu_MARCO), 3013 (Mu_MARCO_GFP), 3014 (Cy_MARCO), 3021 (Cy_MARCO_GFP), 3020 (MuCLD_HuSRCR_GFP) и 3022 (Hu_MARCO_CLD).

[0622] *Характеристика связывания гибридом, продуцирующих анти-MARCO, и антител к MARCO с экспрессируемым на клеточной поверхности MARCO*

[0623] Клетки HEK293T, экспрессирующие MARCO человека (293T_HuMARCO), MARCO мыши (293T_MuMARCO), MARCO яванского макака (CyMARCO), и контрольную линию клеток, экспрессирующую GFP (293T_GFP), культивировали в DMEM (Gibco) с 10% FBS при 37°C. Клетки подсчитывали и затем собирали путем центрифугирования при 400×g в течение 5 минут (мин). Супернатанты удаляли, а клеточные осадки ресуспендировали в Ca²⁺ и Mg²⁺ фосфатно-солевом буфере Дульбекко (D-PBS) в концентрации 1×10⁶ клеток/мл. 100000 клеток на лунку высевали на 96-луночные планшеты с U-образным дном для окрашивания, и все стадии центрифугирования выполняли при 1500 об/мин при 4°C в течение 5 минут, а образцы хранили защищенными от света месте на протяжении всего протокола. Клетки осаждали и ресуспендировали в 100 мкл красителя для оценки жизнеспособности клеток Zombie NIR (BioLegend), приготовленного путем разбавления исходного раствора Zombie NIR диметилсульфоксидом (ДМСО) в 1000 раз в D-PBS. Клетки окрашивали путем инкубации в течение 10 мин при комнатной температуре (КТ) в темноте с последующим гашением реакции окрашивания добавлением 100 мкл среды для окрашивания (D-PBS, содержащей 2% FBS и 2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА)). Клетки осаждали и ресуспендировали в 100 мкл различных супернатантов антител и гибридом, необходимых

для скрининга, и соответствующих изотипических контролей в свежеприготовленной среде для окрашивания, например, PI-M014 и изотипа mIgG2b. Все мкАт тестировали при конечной максимальной концентрации 100 нМ (15 мкг/мл) с последующим трехкратным серийным разведением в 8 точках, включая контроль 0 мг/мл. Окрашивание проводили в течение 1 часа (ч) на льду с последующими 2 промывками в среде для окрашивания. Затем клетки осаждали и ресуспендировали в 100 мкл конъюгированного с аллофикоцианином (APC) козьего вторичного антитела к IgG мыши (Fc-специфического), подготовленного путем 500-кратного разведения исходного раствора антитела в среде для окрашивания, и инкубировали в течение 30 мин на льду. Затем планшеты дважды промывали средой для окрашивания с последующим ресуспендированием в 150 мкл того же буфера для сбора данных на проточном цитометре (Attune NxT, Life Technologies). Данные проточной цитометрии анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (версия 10.6.1), и данные обрабатывали и дополнительно анализировали в программах Microsoft Excel и GraphPad Prism (версия 8). Полумаксимальные эффективные концентрации (EC_{50}) рассчитывали на основе средних геометрических интенсивностей флуоресценции (гСИФ). В случае, когда планшеты не могли быть проанализированы на цитометре, клетки осаждали после промывок и фиксировали в 100 мкл 2% параформальдегида (PFA), приготовленного путем разбавления 16% (масса/объем) исходного раствора (Thermo Fisher) в DPBS, в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем клетки осаждали и фиксатор удаляли с последующим ресуспендированием в 150 мкл среды для окрашивания и хранили при 4°C до сбора данных на проточном цитометре.

[0624] **На Фиг. 6А** показано связывание 33 антител с контрольными клетками GFP-239Т (левая полоса) или клетками, экспрессирующими MARCO человека (средняя полоса) или MARCO мыши (правая полоса). **На Фиг. 6В** показаны гистограммы проточной цитометрии для одного антитела к MARCO, PI-M014, связывающегося с клетками, экспрессирующими huMARCO, muMARCO и SynoMARCO, по сравнению с контрольными клетками (контроль GFP). **На Фиг. 6С** показано титрование PI-M014 и изотипического контрольного антитела, связывающегося с клетками, экспрессирующими huMARCO. PI-M014 связан с huMARCO с EC_{50} 1,37 нМ.

[0625] Характеристика связывания гибридом, продуцирующих антитела к MARCO, и антител к MARCO с рекомбинантным MARCO с помощью ИФА

[0626] Гибридомы из растворов антител или антител к MARCO подвергали скринингу с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) на рекомбинантном человеческом белке MARCO (Pi-114, His-метка). Вкратце, 96-луночные планшеты (Biolegend) покрывали 1 мкг/луночка рекомбинантного белка MARCO на ночь в D-PBS. Планшеты промывали 3 раза PBS/0,1% TWEEN-20/2 mM ЭДТА (промывочный буфер для ИФА) и блокировали 1% BSA в течение 2 часов при комнатной температуре. Антитела инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при конечной максимальной концентрации 5 мкг/мл с последующим трехкратным серийным разведением в 8 точках в PBS, включая контроль 0 мг/мл. Планшеты промывали, как указано выше, и

инкубировали с конъюгированным с HRP козьим вторичным антителом козы к фрагменту F(ab')₂ IgG мыши (Jackson Immuno) в разведении 1:5000 в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали 4 раза в указанном выше промывочном буфере для ИФА и проявляли субстратом TMB в течение 10 минут (Thermo) и останавливали стоп-раствором TMB (1M фосфорной кислоты H₃PO₄), а A450 определяли с помощью планшет-ридера (SpectraMax i3x).

[0627] *Характеристика кинетики антител к MARCO с помощью SPR*

[0628] Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) выполняли на приборе VIAcore™ T200 (GE Healthcare), и все данные собирали при 25°C с использованием многоциклового кинетики. МкАт к мышинному Fc (GE Healthcare) иммобилизовали на биосенсорном чипе CM4 (GE Healthcare) с использованием аминного сочетания с 4500 RU в качестве мишени для иммобилизации мкАт. Серийные разведения были сделаны в подвижном буфере, содержащем 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,05% (об./об.) поверхностно-активного вещества P20. МкАт к мышинному Fc использовали для захвата указанных моноклональных антител к антигену MARCO человека (лиганд). Тестируемые антитела к MARCO представляли собой PI-M014, PI-M015, PI-M017 и PI-M018. Используемым взаимодействующим анализируемым веществом был N-концевой меченный полигистидином ВКД MARCO человека (147-520), называемый PI-RG-3000. В проточные ячейки вводили следующий диапазон концентраций антител: 0,625 нМ, 1,25 нМ, 2,5 нМ, 5 нМ и 10 нМ. Скорость потока составляла 30 мкл/мин, время ассоциации и диссоциации составляли 90 и 600 секунд, соответственно. После каждого цикла (состоящего из фаз захвата антигена, ассоциации и диссоциации с антителами) клеточную поверхность регенерировали путем введения 10 mM глицин-HCl буфера с pH 1,7 в течение 100 секунд при скорости потока 50 мкл/мин. Кинетическую оценку выполняли с использованием программного обеспечения VIAevaluation 3.1 для определения кинетики одного цикла и множества циклов.

[0629] Мономер PI-M014 имел K_D 3,91 нМ в одном цикле SPR и K_D 1,32 нМ в анализе с несколькими циклами. Мономер PI-M015 имел K_D 0,39 нМ в многоцикловом анализе. Мономер PI-M017 имел K_D 0,96 нМ в многоцикловом анализе. Мономер PI-M018 имел K_D 1,65 нМ в многоцикловом анализе.

[0630] *Экспрессия MARCO на поверхности человеческих моноцитарных макрофагах*

[0631] Замороженные CD14⁺ моноциты периферической крови человека, выделенные из моноклеарных клеток периферической крови с помощью негативной иммуномагнитной селекции (StemCell Technologies), размораживали и культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% (об./об.) термоинактивированной FBS (HyClone), 1 mM пирувата натрия, заменимых аминокислот, 2 mM L-глутамина, 55 мкМ 2-меркаптоэтанола и противогрибкового антибиотика (все от Gibco). Моноциты дифференцировали в макрофаги путем культивирования в полной среде RPMI 1640 в присутствии 50 нг/мл колониестимулирующего фактора макрофагов человека (M-CSF)

(PeproTech) при плотности $12-15 \times 10^6$ клеток в чашке диаметром 15 см. На 3-й день дифференцировки в среду добавляли свежий M-CSF. После 7 дней дифференцировки макрофаги аккуратно собирали неферментативным путем с помощью стерильного клеточного скребка (Nunc) в буфер FACS (D-PBS, содержащий 2 mM ЭДТА и 0,5% (мас./об.) бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Sigma)) с последующим центрифугированием при 400xg в течение 5 мин при $\sim 20^\circ\text{C}$.

[0632] Клетки подсчитывали и высевали на 96-луночные планшеты по 250000 клеток на лунку. В каждую лунку добавляли 100 мкл красителя для оценки жизнеспособности клеток Zombie NIR (BioLegend), приготовленного путем 1000-кратного разбавления исходного раствора в D-PBS, и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте. Реакцию гасили добавлением 150 мкл буфера для FACS с последующим центрифугированием при 400xg в течение 5 мин при 4°C . Затем клетки инкубировали в 100 мкл блокирующего раствора, содержащего 2,5% мышиной сыворотки и 2,5% крысиной сыворотки и человеческого TruStain FcX (BioLegend), разведенного в 50 раз в блокаторе Fc-рецепторов (Innovex Biosciences), в течение 20 мин в темноте. Затем клетки промывали и ресуспендировали в 100 мкл различных антител, необходимых для скрининга, и соответствующих изотипических контролей в свежеприготовленном буфере для FACS (PI-M014, PI-M015, PI-M017, PI-M018, мышиный IgG2a и мышиный IgG2b, все конъюгированы с APC с помощью набора для конъюгации Thermo Fisher). мкАт тестировали в концентрациях в одной точке (3,33 мкг/мл для PI-M014 или 5 мкг/мл для других мкАт) и проводили первичную инкубацию в течение 20-30 минут на льду с последующими 2 промывками в буфере для FACS. Клетки ресуспендировали в 150 мкл того же буфера для сбора данных на проточном цитометре (Attune NxT, Life Technologies). Данные проточной цитометрии анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo, и данные обрабатывали и дополнительно анализировали в программах Microsoft Excel и GraphPad Prism.

[0633] PI-M014, связанное с человеческими моноцитарными макрофагами, как показано на **Фиг. 6D**.

[0634] *Анализ мышиного антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ)*

[0635] Макрофаги, происходящие из костного мозга, получали, как показано ранее, с использованием 25 нг/мл мышиного CSF-1 (PeproTech) для дифференцировки. На 6-й день культивирования к культуре BMDM добавляли 25 нг/мл мышиного IFN- γ (PeproTech) на 18 часов. На следующий день клетки стимулировали 200 нг/мл ЛПС (Invivogen) в течение 2 часов перед использованием в анализе АЗКФ. IFN- γ /ЛПС-индуцированные BMDM служили эффекторными клетками, а клетки GFP+ HEK293T, трансдуцированные человеческим MARCO (293T Hc_MARCO) или контролем (293T_GFP), были мишенями. После сбора эффекторные BMDM окрашивали красителем Cell-Trace Violet (Invitrogen) в течение 20 минут при 37°C . 50000 клеток-мишеней высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном и совместно инкубировали с мкАт к MARCO или соответствующим изотипом (от PI-M014 до PI-M018). Антитела серийно разбавляли и готовили в среде в

течение 30 минут при 37°C. Затем эффекторные клетки добавляли в планшеты антигено-мишень в соотношении 3:1 (150000 эффекторов на 50000 мишеней) и инкубировали в течение 2 часов при 37°C. После инкубации клетки окрашивали для оценки жизнеспособности с помощью Zombie NIR (BioLegend), затем фиксировали с помощью 2% параформальдегида (Invitrogen) в течение 20 минут при комнатной температуре, а затем анализировали на проточном цитометре Attune NXT (ThermoFisher). Активность АЗКФ оценивали на основе уровней двойного положительного окрашивания Cell Trace Violet и GFP, считываемых с живых клеток.

[0636] Инкубация клеток-мишеней с PI-M015 и PI-M017 индуцировала активность АЗКФ эффекторных клеток. Результаты обобщены в **таблице 1** ниже.

[0637] *Эпитоп-специфическая сортировка для антител к HuMARCO*

[0638] Систему без меток ForteBio Blitz использовали для анализа эпитопов антител к MARCO.

[0639] Для тандемного формата N-концевой белок MARCO с His-меткой был загружен на зонд к His от ForteBio с последующим определением исходного уровня и последующей ассоциацией с первым антителом. После связывания первого антитела добавляли второе антитело и измеряли ассоциацию для второго набора антител. Любое дополнительное связывание, наблюдаемое для второго антитела, измеренное как увеличение сигнала, указывает на то, что второе антитело связывается с другим эпитопом, в отличие от первого антитела.

[0640] PI-M015 и PI-M017 конкурировали друг с другом за связывание с антигеном MARCO, указывая на то, что они связываются с одним и тем же эпитопом MARCO (**Фиг. 7**). Все остальные антитела связывались с разными эпитопами и не конкурировали ни с каким другим антителом за связывание с MARCO. Однако антитела связывались только с доменом CLD MARCO человека и не связывались с доменом SRCR MARCO человека.

[0641] *Экспрессия MARCO на DTC первичных опухолей человека и лейкоцитах периферической крови (PBL)*

[0642] Экспрессию MARCO оценивали в микроокружении опухолей человека по трем патологиям с помощью проточной цитометрии, рака яичников и рака желудка с использованием недавно разработанных антител к MARCO человека. Опухолевые ткани предварительно диссоциировали как «диссоциированные опухолевые клетки» (DTC) и мгновенно замораживали (Folio Conversant). DTC размораживали в соответствии с рекомендациями производителя и подсчитывали для оценки общего числа жизнеспособных клеток. PBL выделяли из лейкоцитарных пленок (два донора из Стэнфордского центра крови). Суспензии отдельных клеток из DTC и PBL разводили в PBS (Gibco), один раз промывали и окрашивали Zombie NIR (Biolegend) для определения жизнеспособности клеток. Fc-рецепторы также блокировали с помощью комбинации человеческой сыворотки (Jackson Immunoresearch), человеческого FcX (Biolegend) и раствора для блокировки FcR на основе пептидов (Innovex Biosciences). После инкубации с блокирующими FcR реагентами поверхностные рецепторы на DTC окрашивали

коктейлем для проточной цитометрии, включающим маркеры основных субпопуляций внутриопухолевых иммунных клеток, а также изотипические контроли (5 мкг/мл mIgG2a или mIgG2b или крысиный IgG2a) и непосредственно конъюгированные антитела к MARCO человека (5 мкг/мл PI-M017 или PI-M018 или PI-NX-3031). Клетки также фиксировали и подвергали пермеабиллизации (набор буферов для транскрипции True-Nuclear, Biolegend) для определения внутриклеточной экспрессии CD68. PBL окрашивали коктейлем проточной цитометрии, включающим маркеры для основных иммунных субпопуляций крови, а также изотипический контроль (10 мкг/мл hIgG1, конъюгированный меткой PE Zenon) и антитела к MARCO человека (10 мкг/мл PI-3010, PI-3030 и PI-3031, конъюгированные с меткой PE Zenon). Данные для DTC и PBL были получены с использованием анализатора Attune NxT (ThermoFisher) и проанализированы с помощью FlowJo (BD Biosciences).

[0643] На Фиг. 8А и 8В показано, что MARCO экспрессируется в человеческих MDM (Фиг. 8А) и ассоциированных с опухолью макрофагах (TAM) из образцов первичной опухоли человека (рак желудка и рак яичников, Фиг. 8В). На Фиг. 8А и 8В, правый пик(-и) указывает на связывание и окрашивание антител к MARCO PI-M018 или PI-M017, тогда как левый пик указывает на связывание изотипа mIgG2a.

[0644] Сводная информация о связывании и функциональных характеристиках выбранных антител из первой кампании по антителам представлена в таблице 1.

мкАг к huMARCO	Изотип	Эпитопная группа и карта	K _d (нМ)	Связывание эндогенных клеток	EC ₅₀ для 293Т с белком человека (HuMARCO) (нМ)	EC ₅₀ для 293Т с белком яванского макака (SuMARCO) (нМ)	EC ₅₀ для 293Т с белком мыши (MuMARCO) (нМ)	АЗФ/АЗКЦ в анализе BMDM in vitro
PI-M014	mIgG2b	4 (CLD)	1,32	+	7,861	11,07	41,57	Отсутствует
PI-M015 (RDM1)	mIgG2a	1 (CLD)	0,39	+	1,606	1,206	н/с	Есть
PI-M017 (RDM7)	mIgG2a	1 (CLD)	0,96	+	1,59	1,522	н/с	Есть
PI-M018 (RDM9)	mIgG2b	3 (CLD)	1,65	+	1,851	45,4	н/с	Отсутствует

[0645] *н/с=нет связывания

Пример 3: Получение и характеристика антител к MARCO мыши

[0646] Материалы и способы

[0647] *Иммунизация для получения антител к MARCO мыши*

[0648] Крысиные гибридомы, продуцирующие MARCO мыши, были получены путем иммунизации крыс линии Спрег-Доули рекомбинантным мышинным белком MARCO с N-концевой His-меткой, полученным в Pionyr, с использованием адъювантной системы Sigma (SAS) отдельно или попеременно с клетками HEK293, экспрессирующими MARCO мыши, также в SAS. Последовательность используемого рекомбинантного мышинового белка MARCO, меченного N-концевой His-меткой, показана ниже. Рекомбинантный мышинный белок MARCO анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза и с использованием эксклюзионной хроматографии для подтверждения получения правильного молекулярной массы белка.

[0649] Крыс иммунизировали два раза в неделю в область скакательного сустава в Antibody Solutions (Санта-Клара, штат Калифорния) и титры в сыворотке определяли на 21-й день с помощью ИФА. Крыс с достаточными титрами сывороточных антител к MARCO мыши отбирали для электрослияния для получения гибридом. Две заключительные бустер-инъекции проводили на -3 и -2 дни перед сбором в фосфатно-солевом буфере (PBS).

[0650] МкАт к MARCO мыши RDM-9514 было приобретено у компании R&D Biosystems (CUST017 MABP, клон 57914) в виде специально очищенного гибридомного клона, образованного у крыс в ответ на полученный из NS0 рекомбинантный мышинный MARCO Gln70-Ser518.

[0651] *Получение гибридомы*

[0652] Клетки лимфатических узлов собирали у иммунизированных крыс и получали суспензии отдельных клеток. Лимфоциты сливали с миеломной линией клеток SP2/0-Ag 14 (ATCC) с помощью электрослияния с аппаратом для электрослияния ВТХ EC2000+ (Harvard Bioscience). Слитые клетки высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты (Corning) и оставляли на ночь в среде Clona-Cell Medium E, содержащей НТ, (Stem Cell Technologies). На следующий день к культурам добавляли аминокперин (Sigma) до конечной концентрации 1X. Гибриды подпитывали на 6-й и 8-й день и подвергали скринингу на 11-й день.

[0653] *Скрининг гибридом*

[0654] Гибридомы подвергали скринингу с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) либо на рекомбинантном мышинном белке MARCO, либо на рекомбинантном человеческом белке MARCO, в зависимости от иммунизации. Вкратце, 96-луночные планшеты Maxisorp (Nunc) покрывали 0,1 мкг/луночка рекомбинантного белка MARCO на ночь в DPBS, содержащем Ca²⁺ и Mg²⁺ (Gibco, кат. №14040117). Планшеты промывали 3 раза PBS/0,05% TWEEN-20 и блокировали PBS/Ca²⁺, содержащим 2% фетальной бычьей сыворотки. Супернатанты гибридом добавляли в лунки в соотношении 1:1 с буфером PBS/Ca²⁺/2% FBS и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа.

[0660]

ННННННННКGEQGAPGLQGHKGMMPGAPGPPGPPAEKGAKGAMGRDGATGPSGPQG
 PPGVKGEAGLQGPQGAPGKQGATGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPKGETGTKGEKGDGLL
 PGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKGDFGRPGPPGLAGFPGAKGDQGPGLQGVPGP
 PGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPSPGSPGATGLKGSKGDTGLQGQQGRKGESGVP
 GPAGVKGEQSPGLAGPKGAPGQAGQKGDQGVKSSGEQGVKGEKGERGESFQRVRI
 MGGTNRGRAEVYYNNEWGTICDDDWDNNDATVFCRMLGYSRGRALSSYGGGSGNIW
 LDNVNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS

[0661] *Связывание клеток*

[0662] Клоны, положительные на связывание с MARCO с помощью ИФА, тестировали на связывание с MARCO клеточной поверхности путем окрашивания клеток 293 с MARCO человека, клеток 293 с MARCO мыши или контрольных клеток 293 и тестирования с помощью проточной цитометрии с использованием проточного цитометра Intellicyt iQue. Гибридомы, которые были положительными в отношении связывания с MARCO по ИФА и с MARCO клеточной поверхности по проточной цитометрии, были выбраны для субклонирования и очистки.

[0663] *Субклонирование и очистка гибридом*

[0664] Субклонирование исходных гибридом выполняли путем сортировки отдельных клеток на FACSAria. Отдельные клетки сортировали в плоскодонные 96-луночные планшеты для культур тканей в среде Clona-Cell Medium E. Отдельные клетки культивировали в течение 7-9 дней и затем анализировали на специфические к MARCO клоны с помощью ИФА, как описано выше.

[0665] Затем моноклональные гибридомы культивировали для очистки путем выращивания в бессывороточной среде для размножения (AOF, Stem Cell Technologies) и очищали с использованием либо белка А, либо белка G.

[0666] *Генерация последовательностей переменных областей гибридомного антитела*

[0667] Тотальную РНК экстрагировали из (104-106) гибридомных клеток, продуцирующих моноклональное антитело, с использованием набора для очистки RNeasy (Qiagen, кат. № 74134), затем проводили обратную транскрипцию (КТ) для синтеза кДНК с использованием набора для синтеза кДНК Maxima H Minus First Strand (ThermoFisher, кат. № K1651) и обратные праймеры, специфичные для гена, (GSP1). кДНК очищали для удаления GSP и ферментов в реакции ОТ с использованием набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, кат. № 28104). Терминальную дезоксирибонуклеотидилтрансферазу использовали для добавления участка олиго-dA к 3'-концу кДНК (Thermo Scientific, кат. № 10533065), продукт снова очищали (QIAquick PCR Purification Kit, кат. № 28104) перед амплификацией. Затем проводили ПЦР с использованием второго ген-специфического праймера (GSP2) и прямого праймера олиго-dT, который связывает хвост олиго-dA, предварительно добавленный к 3'-концам кДНК. ПЦР-продукты секвенировали. В случаях, когда из ПЦР-продуктов были получены последовательности недостаточного

качества, ПЦР-продукты клонировали посредством ТОРО и трансформировали в *E. coli*, а отдельные колонии обрабатывали для секвенирования.

[0668] Используемые праймеры перечислены ниже:

[0669] GSP1-mk: TTGTCGTTCACTGCCATCAATC

[0670] GSP2-mk: ACATTGATGTCTTTGGGGTAGAAG

[0671] GSP1- mHC: AGCTGGGAAGGTGTGCACAC

[0672] GSP2-mHC: GGGATCCAGAGTTCCAGGTC

[0673] GSP1-rk: GT GAG GAT GAT GTC TTA TGA ACA

[0674] GSP2-rk: GCCATCAATCTTCCACTTGACAC

[0675] GSP1-rHC: GAG ATG STT TTC TCG ATG GG

[0676] GSP2-rHC: GS GGG AAG ATG AAG ACA GAT G

[0677] *Кальцийзависимый анализ на основе ИФА*

[0678] Цель этого анализа состояла в том, чтобы определить кальциевую зависимость в отношении связывания MARCO антителами к MARCO. Этот анализ может применяться как к супернатанту гибридомы, так и к очищенным антителам.

[0679] 0,05 мкг/мл рекомбинантных белков MARCO человека или мыши наносили на 4 микролуночного планшета Nunc-Immuno™ в следующих условиях: в DPBS с Ca²⁺ (Gibco, кат. № 14040117), в DPBS без Ca²⁺ (Gibco, кат. № 14190136) с 2 mM ЭДТА (Invitrogen, кат. № 15575020) - планшет В, в DPBS без Ca²⁺ с 10 mM ЭДТА и в DPBS без Ca²⁺ с 50 mM ЭДТА.

[0680] После того, как планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа или при 4°C в течение ночи, планшеты промывали 3 раза промывочным буфером для ИФА (PBS/0,05% TWEEN-20), затем супернатантом гибридомы (разведение 1:5) или очищенным антителом (1 мкг) разводили в DPBS/Ca²⁺/2% FBS, DPBS без Ca²⁺/2 mM ЭДТА/2% FBS, DPBS без Ca²⁺/10 mM ЭДТА/2% FBS и DPBS без Ca²⁺/50 mM ЭДТА/2% FBS. Планшеты снова инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа.

[0681] Планшеты промывали, как указано выше, и инкубировали с конъюгированным с HRP козьим антителом к IgG мыши (Jackson) или смесью конъюгированных с HRP мышинных антител к IgG крысы (1+2a+2b) 1:1:1 (SouthernBiotech, кат. № 3060-05, 3065-05, 3070-05) разводят 1:5000 в течение 1 часа при комнатной температуре в 4 различных буферах, как указано выше. Затем планшеты промывали и проявляли субстратом TMB (ThermoFisher), останавливали стоп-раствором TMB (Surmodics) и считывали на A450 с помощью планшет-ридера Tecan.

[0682] *Кинетика и эпитоп-специфическая сортировка с использованием прибора ProbeLife Gator*

[0683] Для анализа кинетики связывания и эпитопов антител к MARCO использовали не содержащую меток систему Probe-Life Gator™.

[0684] В кинетическом анализе использовали зонды к Fc мыши или Fc человека для захвата антител к MARCO на зонде, а затем использовали пятистадийный протокол

кинетического анализа для измерения аффинности антител к антигену, включая следующие стадии: исходный уровень, загрузка, исходный уровень, ассоциация и диссоциация. Буфер для кинетических исследований (К-буфер), предоставленный ProbeLife, использовали для установления исходного уровня в течение 60 секунд, а затем зонды к mFc или к hFc загружались 200 нМ антител на 120 с, пока захват не достигал насыщения, измерение исходного уровня в К-буфере проводили еще 60 с, после чего следовала стадия ассоциации с использованием 200 нМ антигена (MARCO человека, MARCO мыши или MARCO яванского макака), а стадия диссоциации выполнялась в К-буфере в течение 5-10 минут. Анализ проводили при 37°C, чтобы максимизировать диссоциацию антител: антиген.

[0685] Для эпитоп-специфической сортировки антител использовали как тандемный, так и сэндвич-формат.

[0686] Для тандемного формата 200 нМ N-концевого меченного His белка MARCO загружали на зонд к His ProbeLife на 120 с или до тех пор, пока связывание не достигало насыщения, после чего следовала стадия «исходный уровень» в течение 60 с, а затем связывали с первым набором насыщающих антител, загруженных при 200 нМ. После связывания первого антитела добавляли второе антитело (100-200 нМ) и измеряли ассоциацию второго набора антител. Любое дополнительное связывание, наблюдаемое для второго антитела, измеренное как увеличение сигнала, указывает на то, что второе антитело связывается с другим эпитопом, в отличие от первого антитела.

[0687] Для анализа в сэндвич-формате первое антитело в концентрации 200 нМ загружали в зонды к mFc или к hFc на 120 с, затем следовала стадия «исходный уровень», а затем связывали с антигеном MARCO (200 нМ) в течение 120 с. Ассоциацию второго антитела при 200 нМ затем измеряли в течение 120 с, чтобы определить, имело ли место дополнительное связывание. В этом формате, где первое антитело имело низкую концентрацию, после первой ассоциации добавляли дополнительное изотипическое контрольное антитело, чтобы насытить свободные сайты связывания на зонде. Все зонды и буферы были заказаны непосредственно у ProbeLife.

[0688] *Окрашивание MARCO на BMDM гибридами, продуцирующими антитела к MARCO мыши*

[0689] Бедро и голени трех самок мышей C57BL/6 (Jackson Laboratories) очищали и измельчали в среде для окрашивания (0,5% (мас./об.) BSA (Sigma) и 2 мМ ЭДТА в D-PBS) с использованием ступки и пестика. Затем образцы пропускали через фильтр с диаметром пор 40 мкм, промывали D-PBS и осаждали при 400×g в течение 5 мин при комнатной температуре. Клеточные осадки ресуспендировали в 5 мл буфера BD Pharm Lyse (BD Biosciences) и проводили лизис эритроцитов при комнатной температуре в течение 5 минут с последующим гашением 10 объемами среды для окрашивания. Клетки осаждали при 400х г в течение 5 минут при комнатной температуре и ресуспендировали в среде для культивирования макрофагов, состоящей из среды Дульбекко в модификации Искова с добавлением 10% (об./об.) фетальной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone) и

противогрибкового раствора с антибиотиком (Gibco), при плотности 15×10^6 клеток/мл в чашках диаметром 15 см. Эти мононуклеарные клетки костного мозга стимулировали 25 нг/мл мышинового макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) (PeproTech) в течение 7 дней для получения макрофагов M0 и дифференцировки в M1-подобные макрофаги путем добавления среды с ЛПС в количестве 100 нг/мл на 6-й день и в M2-подобные макрофаги путем добавления 20 нг/мл IL-10. После 18 часов инкубации при 37°C с поляризующими цитокинами M0, M1 и M2-подобные макрофаги промывали DPBS и инкубировали в 6 мл 2 mM ЭДТА в течение 10 минут для ускорения открепления клеток. Клетки осторожно соскабливали в дополнительные 6 мл среды для окрашивания, описанной выше, подсчитывали и высевали на 96-луночные планшеты по 250000 клеток на лунку. В каждую лунку добавляли 100 мкл красителя для оценки жизнеспособности клеток Zombie NIR (BioLegend), приготовленного путем 1000-кратного разбавления исходного раствора в D-PBS, и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте. Реакцию гасили добавлением 150 мкл среды для окрашивания с последующим центрифугированием при 400xg в течение 5 мин при 4°C. Затем клетки инкубировали в 100 мкл блокирующего раствора, содержащего 2,5% мышиной сыворотки и 2,5% крысиной сыворотки и мышинового TruStain FcX PLUS (BioLegend), разведенного в 50 раз в блокаторе Fc-рецепторов (Innovex Biosciences), в течение 20 мин в темноте. Затем клетки промывали и ресуспендировали в 100 мкл различных антител и гибридом, необходимых для скрининга, и соответствующих изотипических контролей в свежеприготовленном буфере для FACS, содержащем 2% FBS в DPBS с Ca²⁺ (RDM-9514, NX-3012, NX-3014, NX-3016, NX-3017, IgG2a крысы и IgG1 крысы, все конъюгированы с PE с помощью набора PE Lightning). RDM-9514 тестировали при конечной максимальной концентрации 10 мкг/мл с последующим 8-точечным трехкратным серийным разведением в PBS с максимальной дозой 10 мкг/мл. Гибридомы внутреннего контроля тестировали при концентрации в одной точке 5 мкг/мл. Окрашивание проводили в течение 20-30 мин на льду с последующими 2 промывками в буфере для FACS. Клетки ресуспендировали в 150 мкл того же буфера для сбора данных на проточном цитометре (Attune NxT, Life Technologies). Данные проточной цитометрии анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (версия 10.6.1), и данные обрабатывали и дополнительно анализировали в программах Microsoft Excel и GraphPad Prism (версия 8). Данные наносили на график в виде дельты гСИФ между антителом и соответствующим изотипом. В случае, когда планшеты не могли быть проанализированы на цитометре, клетки осаждали после промывок и фиксировали в 100 мкл 2% параформальдегида (PFA), приготовленного путем разбавления 16% (масса/объем) исходного раствора (Thermo Fisher) в DPBS, в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем клетки осаждали и фиксатор удаляли с последующим ресуспендированием в 150 мкл среды для окрашивания и хранили при 4°C до сбора данных на проточном цитометре.

[0690] *Окрашивание MARCO на опухолях с помощью конъюгированных с PE мкАт к MARCO мыши*

[0691] Опухоли Py8119 и CT26 отбирали у мышей, когда они достигали объема ~ 400 мм³. Жир и волокнистый материал удаляли из опухолей путем иссечения. Затем опухоли взвешивали и обрабатывали для получения суспензии отдельных клеток с помощью комбинации механической и ферментативной диссоциации. После измельчения тканей опухоли подвергали ферментативному расщеплению с использованием оптимизированного ферментного коктейля (Miltenyi Biotec, набор для диссоциации опухолей, мышь, 130-096-830) с помощью пробирок softMACS C (Miltenyi Biotec, 130-093-235) в приборе gentleMACS Octo Dissociator (Miltenyi Biotec, 130-095-937). После диссоциации образец наносили на фильтр для удаления любых оставшихся более крупных частиц. Суспензию одиночных клеток опухолевых тканей окрашивали с использованием панели антител для проточной цитометрии. Панель антител для оценки субпопуляций миелоидных клеток включала антитела, специфичные к CD45, XCR1, F4/80, CD64, CD11c, Ly6C, CD11b, Ly6G, CD24, MHC класса II, а также маркеры линии дифференцировки в канале исключения (CD45R, CD90.2, CD3e, NKp46, CD19, Siglec F). Панель антител для оценки субпопуляций лимфоидных клеток включала антитела, специфичные к CD45, CD4, CD25, B220, NKp46, CD44, CD90.2, CD8a, CD11b и CD49b. Антитела к MARCO, используемые для окрашивания опухолей у мышей, представляли собой RDM-9514, PI-NX-3012, PI-NX-3021, PI-NX-3016, PI-NX-3017, изотипы крысиного IgG1 и крысиного IgG2a в концентрации 5 мкг/мл. Все данные собирали на проточном цитометре Attune (Thermo Fisher) и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo.

[0692] *Конкурентный анализ с использованием ЛПНП на рекомбинантном MARCO мыши и человека*

[0693] 96-луночный планшет с высокой степенью связывания от MSD покрывали 4 мкг/мл MARCO мыши или 4 мкг/мл MARCO человека (R&D Biosystems). После блокирования планшета PBST и 5% BSA в течение часа в планшет добавляли титрованные антитела к MARCO мыши или человека и инкубировали в течение 30 минут. К антителу добавляли биотинилированный человеческий ЛПНП (860 пМ или 2 мкг/мл) и смесь антитело/ЛПНП инкубировали в течение часа, чтобы позволить смеси достичь равновесия связывания. Планшеты промывали и определяли связанный биотинилированный ЛПНП с помощью сульфо-меченного стрептавидина, который генерирует электрохемилюминесцентный сигнал при добавлении буфера для считывания и подаче электричества на электроды в планшете от MSD. IC50 рассчитывали с использованием 4-параметрической аппроксимации кривой в программе GraphPad Prism.

[0694] **Результаты**

[0695] Были созданы и охарактеризованы множество антител, которые связывались с доменом SRCR MARCO мыши. 909 антител-кандидатов были идентифицированы в первичном скрининге на основе ИФА с использованием очищенного MARCO мыши, MARCO человека, CLD мыши-SRCR человека, CLD человека-SRCR мыши и MSR1 мыши. Вторичный скрининг связывания с клетками 293T, экспрессирующими MARCO мыши, или контроль GFP, позволил выявить 275 кандидатов. Скрининг связывания с

эндогенными мышинными BMDM позволил выявить 40 кандидатов. В результате заключительного скрининга только связывающих SRCR веществ было отобрано 20 кандидатов. Кандидатов проверяли на наличие дополнительных биофизических характеристик. Биофизическая характеристика полученных лучших антител к MARCO мыши показана в **таблице 2**. Эти антитела не продемонстрировали связывания с клетками 293T HuMARCO или клетками 293T CyMARCO. Последовательности выбранных антител к MARCO мыши показаны в таблице перечня последовательностей. CDR были определены с использованием определения AbM.

МакАт к muMARCO	Изотип	Группа SRCR (Последовательность CDR3)	Эпитопная группа	K_{on} по Biacore (1/Мс)	K_{off} по Biacore (1/с)	EC_{50} 293Т для белка мышы (MuMAR (нМ)	EC_{50} для конкурентного анализа с использованием ЛППП (нМ)	Связывание MSRI	Связывание с BMDM
RDM- 9514	Крысиный IgG1	11	2	1,36E +05	6,95E- 07	0,83- 0,86	0,38	-	+
PI-NX- 3001 (PI-3006)	Крысиный IgG2a	1	2	1,88E +05	7,89E- 07	0,48- 1,09	0,4	-	Н/Д
PI-NX- 3003	Крысиный IgG2a	8	2	2,16E +05	5,40E- 07	1,00	0,23	+/-	+
PI-NX- 3004	Крысиный IgG2a	10	2	3,45E +05	3,58E- 08	0,92	0,17	+/-	Н/Д
PI-NX- 3012	Крысиный IgG2a	1	2	1,54E +05	2,48E- 07	0,80	0,17	-	+
PI-NX- 3013	Крысиный IgG2a	2	2	2,40E +05	4,50E- 07	0,34	0,36	+/-	+
PI-NX- 3021 (PI- 3007)	Крысиный IgG2a	3	2	1,91E +05	2,11E- 05	0,47- 0,75	0,25	-	+

PI-NX-3016 (PI-3008)	Крысиный IgG1	1	2	1,84E+05	1,27E-06	0,36-0,59	0,34	-	+
PI-NX-3017 (PI-3009)	Крысиный IgG1	6	2	1,55E+05	2,35E-07	0,66-1,30	0,14	-	+

[0696] RDM-9514 связан с доменом SRCR MARCO. RDM-9514 также блокировал связывание ЛПНП с MARCO дозозависимым образом (Фиг. 9) и связывался с экспрессированным на поверхности MARCO на МНСII^{high} ТАМ и МНСII^{low} ТАМ, выделенных из опухолей СТ26 и опухолей Py8119 (Фиг. 10А). Окрашивание мышинным антителом RDM-9514 также показало, что MARCO экспрессируется на ТАМ и моноцитах в модели сингенной опухоли СТ26 (Фиг. 10В).

[0697] Экспрессию MARCO на мышинных BDMD после поляризации макрофагов с помощью IL-10 также оценивали с помощью вновь созданных антител к MARCO мыши. PI-NX-3017 (левая панель, переименованное в PI-3009), PI-NX-3016 (средняя левая панель, переименованное в PI-3008), PI-NX-3021 (средняя правая панель, переименованное в PI-3007) и PI-NX-3012 (правая панель), каждое из которых связано с мышинными BDMD (Фиг. 11А). Те же самые антитела также связывались с MARCO на ТАМ (правая полоса) и моноцитах (левая полоса), выделенных из опухолей в модели сингенной опухоли СТ26 (Фиг. 11В, n=2).

Пример 4: Эффективность in vivo антител к MARCO мыши при моно- и комбинированной терапии

[0698] **Материалы и способы**

[0699] *Комбинированная терапия in vivo с антителом к PD-1 в сингенной модели СТ26*

[0700] Все антитела для использования in vivo были проверены на наличие эндотоксина и использовали на уровне не более 0,2 ЕЭ/мг белка. Было получено антитело к PD-1 [клон RMP1-14] в формате мышинового IgG1 D265А. Были получены изотипические контроли мышинный IgG1 [клон MOPC-21] и мышинный IgG2a [клон C1.18.4]. PI-3006, PI-3007, PI-3008 и PI-3009 были получены в клетках НЕК293 и оценены на монодисперсность и чистоту с помощью ЭХ и ДСН-ЭХ, а также на эндотоксины. Антитела также тестировали на связывание клетками 293Т со сверхэкспрессией MARCO мыши и на отсутствие связывания с исходными клетками 293Т с помощью проточной цитометрии.

[0701] Самок мышей BALB/c в возрасте около восьми недель получали от Taconic Biosciences (Ренсселер, штат Нью-Йорк). Линию опухолевых клеток мыши СТ26.WT (CRL-2638) получали из Американской коллекции типовых культур (АТСС) и культивировали в соответствии с их рекомендациями. Клетки после минимального

количества пассажей ресуспендировали в концентрации 1×10^7 клеток/мл в бессывороточной $1 \times$ DPBS (Gibco). Суспензию опухолевых клеток вводили подкожно в выбритый нижний правый вентральный бок мышей BALB/c под анестезией изофлураном. Рост объема опухоли отслеживали два раза в неделю путем перпендикулярного измерения диаметра опухоли и рассчитывали по формуле $(\text{мм}^3) = 0,5 \times (\text{длина}) \times (\text{ширина})^2$. В шесть групп лечения случайным образом распределяли по 10 животных в каждую, когда средний размер опухолей достигал 97 мм^3 . Для лечения лекарственными средствами мышам вводили внутривентрально один раз каждые 5 дней, всего 4 дозы (Q5Dx 4) антитело изотипического контроля IgG2a мыши (клон C1.18.4) в дозе 15 мг/кг, антитело изотипического контроля IgG1 мыши (клон MOPC-21) в дозе 5 мг/кг, антитело к PD-1 мыши (клон RMP1-14, полученный рекомбинантно в формате мышинового IgG1 D265A и названный PI-0004-AB) в дозе 5 мг/кг отдельно или в комбинации с антителами к MARCO мыши (PI-3006, PI-3007, PI-3008 и PI-3009) в дозе 10 мг/кг. Все исследования проводили в соответствии с институциональным комитетом по уходу и использованию животных Explora Biolabs согласно протоколу EB17-010. Мыши содержали в условиях, описанных в руководстве NIH по уходу и использованию лабораторных животных в соответствии с Законом США о благополучии лабораторных животных Министерства сельского хозяйства США. Животные имели неограниченный доступ к корму Lab Diet и воде для грызунов. Исследователь или ветеринарный персонал обследовали мышей минимум два раза в неделю на предмет клинических отклонений, которые могут потребовать эвтаназии. Мышей с потерей массы тела $>20\%$ по сравнению с исходной массой подвергали эвтаназии.

[0702] *Анализ противоопухолевого вторичного ответа*

[0703] Мышам BALB/c, у которых не было опухолей в исследовании модели опухоли CT26 с лечением антителами к MARCO и антителом к PD-1, как описано выше, повторно вводили 1×10^6 опухолевых клеток CT26 в левый вентральный бок. Клетки EMT6 вводили подкожно в противоположный правый вентральный бок в качестве контрольной линии клеток для отслеживания роста опухоли в течение периода исследования. В течение исследования мышам не проводили никакого дополнительного лечения. Объем опухоли измеряли в течение 35 дней после повторной имплантации.

[0704] *Фармакодинамика (ФД) и эффективность одного агента в виде антитела к MARCO in vivo в модели CT26*

[0705] Самок мышей BALB/c в возрасте около восьми недель получали от Taconic Biosciences (Ренсселер, штат Нью-Йорк). Линию опухолевых клеток мыши CT26.WT (CRL-2638) получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC) и культивировали в соответствии с их рекомендациями. Клетки после минимального количества пассажей ресуспендировали в концентрации 1×10^7 клеток/мл в бессывороточной $1 \times$ DPBS (Gibco). Суспензию опухолевых клеток вводили подкожно в выбритый нижний правый вентральный бок мышей BALB/c под анестезией изофлураном. Рост объема опухоли отслеживали два раза в неделю путем перпендикулярного измерения

диаметра опухоли и рассчитывали по формуле $(\text{мм}^3) = 0,5 \times (\text{длина}) \times (\text{ширина})^2$. В две группы лечения случайным образом распределяли по 10 животных в каждую, когда средний размер опухолей достигал 109 мм^3 . Для лечения лекарственным препаратом мышам вводили внутривенно один раз в 7 дней (Q7D) антитело изотипического контроля IgG2a мыши (клон C1.18.4) и антитело к MARCO мыши (PI-3008) в дозе 10 мг/кг . Все исследования проводили в соответствии с институциональным комитетом по уходу и использованию животных Explora Biolabs согласно протоколу EB17-010. Мыши содержали в условиях, описанных в руководстве NIH по уходу и использованию лабораторных животных в соответствии с Законом США о благополучии лабораторных животных Министерства сельского хозяйства США. Животные имели неограниченный доступ к корму Lab Diet и воде для грызунов. Исследователь или ветеринарный персонал обследовали мышей минимум два раза в неделю на предмет клинических отклонений, которые могут потребовать эвтаназии. Мышей с потерей массы тела $>20\%$ по сравнению с исходной массой подвергали эвтаназии. Схема временной шкалы исследования показана на **Фиг. 15А**.

[0706] *Фармакокинетический (ФК) анализ*

[0707] ФК анализ MARCO мыши использовали для количественного определения уровней антител к лекарственному средству в сыворотке мыши. 96-луночный планшет с высокой степенью связывания от MSD покрывали 2 мкг/мл mMARCO (PI-RG-3016). После блокирования в течение часа блокирующим буфером (PBST, 5% BSA (PBS, 0,01% Tween-20, BSA) в планшет добавляли образцы для стандартной кривой и образцы разведенной сыворотки и инкубировали в течение 2 часов на шейкере для планшетов. И образцы, и стандартную кривую нормализовали до конечной концентрации 5% мышинной сыворотки. Планшет промывали в DPBS++ (Gibco), 0,05% Tween-20, 1% BSA и определяли связанные антитела к MARCO с использованием сульфо-меченного антитела к IgG2a мыши (Jackson Immuno). Сульфомеченное антитело генерирует электрохемилюминесцентный сигнал при добавлении буфера для считывания и подаче электричества на электроды в планшете от MSD. Уровни антител в образцах сыворотки количественно определяют путем интерполяции стандартной кривой с использованием 4-параметрической аппроксимации кривой в программе MSD.

[0708] *Секвенирование РНК и анализ путей опухолей, лимфоузлов и селезенки из исследования ФД СТ26*

[0709] Первая временная точка для определения показателей ФД была через 4 часа после внутривенного введения антител. У каждой мыши отбирали кровь (сыворотку), селезенку, опухоль и дренирующие опухоль лимфатические узлы, а ткани быстро замораживали в жидком азоте. Вторая временная точка была через 4 часа после второй внутривенной дозы антител, которая произошла через 6 дней после первой внутривенной дозы. У каждой мыши отбирали кровь (сыворотку), селезенку, опухоль и дренирующие опухоль лимфатические узлы, а ткани быстро замораживали в жидком азоте. Мгновенно замороженные образцы были отправлены в Medgenome Inc. для гомогенизации тканей с

использованием Biospec Beadbeater в буфере RLT+BME и экстракции РНК с использованием набора Qiagen All Prep и Biospec Beadbe. Количество и качество мРНК оценивали с помощью Nanodrop и Agilent Bioanalyzer перед тем, как перейти к подготовке библиотеки и анализу методом секвенирования РНК для определения изменений в экспрессии генов, индуцированных MARCO, на ранних и поздних временных точках ФД. Были получены дифференциально экспрессированные гены (с повышенной и пониженной экспрессией) с FDR ($<0,05$) и пороговыми значениями $\text{cpm} >2$, а также был проведен анализ путей GSEA и построены графики с использованием анализов Cytoscape, KEGG и Hallmarks. Гены IgV, наблюдаемые в списке дифференциально экспрессируемых генов из селезенки, обработанной PI-3008 через 4 часа, наносили на график с использованием тепловой карты.

[0710] *Получение афукозилированных антител*

[0711] Афукозилированное PI-3008 с мышинным Fc mIgG2a было получено и протестировано *in vivo*. Фукозилированное антитело PI-3008 и антитело изотипа mIgG2a использовали в качестве контролей.

[0712] Опухолевые клетки CT26 (1×10^6 клеток на мышь) имплантировали на 0 день. Введение афукозилированного антитела PI-3008 внутривенно (10 мг/кг; Q7dx3) начинали, когда средний объем опухолей достигал ~ 100 мм³.

[0713] *Анализ эффекторно нефункциональных антител*

[0714] Мутация N297A была сконструирована в Fc мышинового IgG2a PI-3008 для получения эффекторно нефункционального мкАт PI-3021. PI-3008 и эффекторно нефункциональное PI-3021 тестировали отдельно и в комбинации с антителом к PD-1 на мышинной модели CT26. Самкам мышей Balb/c подкожно инокулировали сингенные опухолевые клетки CT26 (1×10^6 клеток на мышь) на 0 день и вводили дозы PI-3008 (Fc ДТ; 10 мг/кг), PI-3021 (эффекторно нефункциональное; 10 мг/кг), анти-PD-1 (5 мг/кг) и соответствующие изотипические контроли (10 мг/кг) в качестве отдельного агента или в комбинации с анти-PD1 (N=10/группа), когда объем опухоли достигал в среднем ~ 100 мм³. Животным вводили дозы препарата внутривентально каждые 5 дней, всего четыре дозы. Объемы опухолей отслеживали с течением времени и представляли в виде средних значений по группе, отдельных объемов опухолей в конце исследования или в виде %TGI.

[0715] **Результаты**

[0716] Мышиные антитела к MARCO продемонстрировали значительную противоопухолевую эффективность в модели CT26 в комбинации с антителом к PD-1. На **Фиг. 12** показан объем опухоли в группах мышей, получавших лечение изотипическим антителом; только антителом к PD-1; или PI-3008 с антителом к PD-1, PI-3007 с антителом к PD-1, PI-3009 с антителом к PD-1 и PI-3007 с антителом к PD-1. PI-3006 и антитела к PD-1 приводили к 10% ремиссии рака (CR), в то время как PI-3007 и PI-3009 в комбинации с антителами к PD-1 приводили к 20% CR. PI-3008 имело лучший ответ и TGI в целом. На **Фиг. 13А-Д** показаны ответы у отдельных мышей после лечения изотипическим контролем, антителами к PD-1, PI-3008+антителами к PD-1 или PI-3009+антителами к PD-

1. PI-3008 (**Фиг. 13C**) и PI-3009 (**Фиг. 13D**) продемонстрировали наилучшую противоопухолевую эффективность в комбинации с антителом к PD-1.

[0717] *Получение афукозилированных антител*

[0718] PI-3008 продемонстрировало лучшую противоопухолевую активность в отношении одного агента (монотерапии), чем вариант с усиленным Fc (PI-3008-Afus). Афукозилированное PI-3008 не проявляло заметной эффективности в монотерапии по сравнению с фукозилированным PI-3008 (**Фиг. 13E, 13F, и 13G**). Не желая быть связанными какой-либо теорией, эти данные свидетельствуют о том, что опосредованное усиленным Fc взаимодействие не требуется для монотерапии

[0719] *Анализ эффекторно нефункциональных антител*

[0720] Эффекторно нефункциональное PI-3008 (PI-3021) также не приводило к повышенной противоопухолевой эффективности. Противоопухолевая эффективность PI-3008 в комбинации с анти-PD-1 была устойчивой и более выраженной, чем у комбинации PI-3021/анти-PD-1 (**Фиг. 13H**). В модели CT26 PI-3021 в комбинации с анти-PD1 не приводило к противоопухолевой активности того же уровня, что и PI-3008 (**Фиг. 13H**). В конце исследования, на 22-й день, PI-3008 продемонстрировало значительное уменьшение объема опухоли по сравнению с одним анти-PD-1, в то время как PI-3021 не продемонстрировало статистической значимости (**Фиг. 13I**). Кроме того, процент ингибирования роста опухоли (%TGI) был выше у PI-3008 по сравнению с PI-3021 у отдельных мышей, получавших комбинированную терапию (**Фиг. 13J и 13K**). Наконец, мышинные BMDM, обработанные *in vitro* PI-3021, не показали активации провоспалительных путей, как это наблюдается для PI-3008, через 4 часа обработки (данные не показаны). Не желая быть связанными теорией, эти данные предполагают, что PI-3008 с фукозилированным Fc является оптимальным форматом Fc для желаемой противоопухолевой активности *in vivo* в мышинной модели CT26, устойчивой к антителу к PD-1. Однако PI-3021 продемонстрировало такую же противоопухолевую активность, как и PI-3008, в чувствительной к антителу к PD1 модели E0771 (**Пример 11 и Фиг. 38**), что свидетельствует о том, что активность антитела к MARCO также может быть обусловлена целевой активностью в отношении MARCO в дополнение к Fc-опосредованному сигналингу.

[0721] Комбинированное лечение антителом к MARCO и антителом к PD-1 также приводило к долговременной противоопухолевой иммунной памяти после заражения опухолью CT26 (**Фиг. 14**). Мышам, у которых не было опухолей после первого лечения антителами к MARCO, повторно имплантировали опухолевые клетки CT26 или опухолевые клетки EMT6. Как показано на **Фиг. 14**, рост повторно имплантированных опухолевых клеток CT26 не наблюдали у мышей, которых предварительно лечили антителами к MARCO и к PD-1.

[0722] Фармакодинамику (ФД) и противоопухолевую эффективность одного антитела к MARCO, PI-3008, также оценивали на модели колоректальной опухоли CT26 при монотерапии одним агентом (**Фиг. 15A-15C**). Антитело к MARCO PI-3008

продемонстрировало значимой эффективности в монотерапии в модели СТ26. На **Фиг. 15А** показана временная шкала ФД исследования. На **Фиг. 15В** показано, что лечение PI-3008 уменьшало размер опухоли у мышей через 6 дней после введения первой дозы по сравнению с изотипическим контрольным антителом. На **Фиг. 15С** показано количественное определение антитела PI-3008 у мышей после первой и второй дозы.

[0723] Анализ молекулярного профиля опухолей СТ26 также проводили на образцах, взятых через 4 часа после первой и второй дозы PI-3008 и изотипических антител. Антитело к MARCO активировало несколько иммунных путей. После дозы 1 экспрессия генов в пути актин-опосредованного клеточного сокращения повышалась с FDR пути $<0,1$. Через 4 часа после второй дозы повышалась экспрессия генов пути активации и активности киназы, сигнального пути Toll-подобного рецептора, путей TLR 4 и 9, связывания и активности ГТФазы и путей сигнальной трансдукции RAS-Rho. После первой и второй дозы активировались следующие пути: гуморальный иммунный ответ, NK-опосредованный иммунитет, активация NK, продукция IL-2 и IL-12, уничтожение клеток, регуляция эффекторного процесса, Т-клеточная пролиферация, активация, дифференцировка, хемотаксис и миграция, межклеточная адгезия, фагоцитоз и миелоидная дифференцировка.

[0724] Были определены пути KEGG, индуцированные антителом к MARCO в опухолях СТ26 *in vivo*. После дозы 1 в число 10 наиболее дифференцированно активируемых путей входили: цитотоксичность, опосредованная натуральными клетками-киллерами, сигнальный путь Т-клеточного рецептора, сигнальный путь JAK/STAT, взаимодействие цитокин-цитокиновый рецептор, кишечная иммунная сеть для продукции IgA, трансэндотелиальная миграция лейкоцитов, сигнальный путь хемокинов, линия дифференцировки гемопоэтических клеток, сахарный диабет II типа и сигнальный путь Fc-эпсилон RI. После дозы 1 в число 10 наиболее дифференциально подавленных путей входили: гомологичная рекомбинация, болезнь Альцгеймера, РНК-полимераза, метаболизм аргинина и пролина, цитратный цикл (цикл TCA), метаболизм порфирина и хлорофилла, деградация валина, лейцина и изолейцина, биосинтез ненасыщенных жирных кислот, биосинтез N-гликанов и биосинтез аминокислот-тРНК.

[0725] После дозы 2 в число 10 наиболее дифференцированно активируемых путей в опухолях СТ26 входили: взаимодействие цитокин-цитокиновый рецептор, цитотоксичность, опосредованная натуральными клетками-киллерами, первичный иммунодефицит, сигнальный путь хемокинов, линия дифференцировки гемопоэтических клеток, сигнальный путь JAK/STAT, сигнальный путь Т-клеточного рецептора, кишечная иммунная сеть для продукции IgA, взаимодействие нейроактивного лиганда с рецептором и сигнальный путь Fc-эпсилон RI. После дозы 2 в число 10 наиболее дифференциально подавленных путей входили: гликолиз, глюконеогенез, метаболизм пропаноата, протеасома, цитратный цикл, цикл TCA, сокращение сердечной мышцы, болезнь Альцгеймера, болезнь Гентингтона, окислительное фосфорилирование, рибосомы и болезнь Паркинсона.

[0726] Также были определены пути KEGG, индуцированные антителом к MARCO, в дренирующих опухоль лимфатических узлах *in vivo*. После дозы 1 в число 10 наиболее дифференцированно активируемых путей входили: сигнальная система фосфатидилинозитола, фокальная адгезия, метаболизм инозитолфосфата, аксональное наведение, адгезионный контакт, пути при злокачественном новообразовании, регуляция актинового цитоскелета, прогестерон-опосредованное созревание ооцитов, сигнальный путь ERBB и сигнальный путь Wnt. После дозы 1 в число 10 наиболее дифференциально подавленных путей входили: биосинтез аминоксил-тРНК, лизосомы, метаболизм гистидина, метаболизм лекарственных препаратов цитохромом P450, протеасомы, болезнь Альцгеймера, болезнь Гентингтона, болезнь Паркинсона, окислительное фосфорилирование и рибосомы.

[0727] После дозы 2 в число 10 наиболее дифференциально активируемых путей в дренирующих опухоль лимфатических узлах входили: фокальная адгезия, сигнальная система фосфатидилинозитола, сигнальный путь нейротрофина, сигнальный путь инсулина, метаболизм инозитолфосфата, сигнальный путь MAPK, пути при злокачественном новообразовании, регуляция актинового цитоскелета, сигнальный путь ERBB и адгезионный контакт. После дозы 2 в число 10 наиболее дифференциально подавленных путей входили: метаболизм ксенобиотиков цитохромом p450, линия дифференцировки гемопоэтических клеток, лизосомы, болезнь Альцгеймера, протеасомы, взаимодействие цитокин-цитоклиновый рецептор, болезнь Гентингтона, болезнь Паркинсона, окислительное фосфорилирование и рибосомы.

[0728] Также определяли пути KEGG, индуцированные антителом к MARCO в селезенке *in vivo*. После дозы 1 активированные пути включали: взаимодействие с рецептором ECM, фокальную адгезию, плотный контакт, адгезионный контакт, протеасому, каскады комплемента и коагуляции, молекулы клеточной адгезии и CAM, пути при злокачественном новообразовании, аритмогенную кардиомиопатию правого желудочка ARVC, сигнальный путь Wnt, регуляцию актинового скелета, аксональное наведение, болезнь Гентингтона, инфекцию, вызванную патогенной *Escherichia coli*, болезнь Альцгеймера, трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов, взаимодействие цитокин-цитоклиновый рецептор, базально-клеточную карциному, меланогенез и сигнальный путь Hedgehog. Подавленные пути включали: клеточный цикл, биосинтез аминоксил-тРНК, репарацию ошибочно спаренных оснований, биосинтез гликозилфосфатидилинозитол ГФИ-якоря, метаболизм глицерофосфолипидов и гомологичную рекомбинацию.

[0729] После дозы 2 активированные пути в селезенке включали: клеточный цикл, протеасомы, сигнальный путь T-клеточного рецептора, репликацию ДНК, убиквитин-опосредованный протеолиз, регуляцию актинового цитоскелета, адгезионный контакт, инфекцию, вызванную патогенной *Escherichia coli*, базальные факторы транскрипции, пентозофосфатный путь, опосредованный Fc-гамма-R фагоцитоз, сигнальный путь нейротрофина, регуляцию аутофагии, гликолиз, глюконеогенез, мейоз ооцитов,

хронический миелоидный лейкоз, цитратный цикл ТСА, сигнальный путь Wnt, сигнальный путь P53 и цитотоксичность, опосредованную натуральными клетками-киллерами. Подавленные пути включали: переносчики ABC, биосинтез гликозилфосфатидилинозитол ГФИ-якоря, РНК-полимеразу, рибосомы, метаболизм арахидоновой кислоты, метаболизм глицерофосфолипидов.

[0730] Также был проведен более глубокий анализ дифференциально экспрессируемых генов в опухолях СТ26, обработанных PI-3008, после дозы 1 и дозы 2. Повышалась экспрессия генов, ассоциированных с NK-клетками, такие как Klrk1, Nrg1 и Prf1; генов, ассоциированных с провоспалительной и иммунной активацией, такие как Cd40, Cd8 α , Nod2, Tlr4, Tnf, Nlrp3, Cd274, Clec9 α и Cd200r3; и провоспалительные цитокины, такие как Il-27, Cxcl9, Cxcl10 и Cxcl12. На **Фиг. 16А** показаны уровни экспрессии Klrk1, Nrg1, Tlr4, Il-27, Cd8 α , Cxcl9, Cxcl10 и Tnf в микроокружении опухоли СТ26 после лечения PI-3008 или изотипическим контрольным антителом. В каждом случае лечение PI-3008 повышало экспрессию гена. На **Фиг. 16В** показано сравнение генов, экспрессия которых повысилась в опухолях BMDM и СТ26 после лечения PI-3008.

[0731] Кроме того, антитело к Марсо 3008 повышало экспрессию генов IG-V в селезенке СТ26 после первой дозы. Известно о 154 аннотированных генах IG-V с CPM > 1. Экспрессия всех 154 аннотированных генов IG-V повышалась при лечении PI-3008, в то время как 138/154 дифференциально экспрессировались с FDR<0,05. Таким образом, поликлональная экспансия плазматических клеток или активированных В-клеток в маргинальной зоне селезенки может происходить при лечении антителом к MARCO для активации аутоантигенов или опухолевых антигенов, например, активации NK.

Пример 5: Получение и характеристика дополнительных антител к MARCO человека

[0732] Материалы и способы

[0733] Была проведена дополнительная кампания по получению антител для разработки антител, которые связываются с доменом SRCR MARCO человека.

[0734] Иммунизация для получения антител к MARCO человека

[0735] Крысиные гибридомы, продуцирующие антитела к MARCO человека, получали путем иммунизации крыс линии Спрег-Доули рекомбинантным человеческим белком MARCO с N-концевой His-меткой с использованием адъювантной системы Sigma (SAS) отдельно или попеременно с клетками НЕК 293, экспрессирующими MARCO человека. Рекомбинантный человеческий белок MARCO с N-концевой His-меткой содержал остатки 147-520 MARCO человека. Рекомбинантный человеческий белок MARCO подвергался контролю качества на предмет правильного фолдинга и образования тримеров. Напротив, белок MARCO человека (Pi 114), ранее использовавшийся в неудачной кампании по получению антител к MARCO человека, описанной в **Примере 2**, состоял из модифицированного домена ВКД MARCO, содержащего остатки 147-419 домена CLD и остатки 424-520 домена SRCR.

[0736] Крыс иммунизировали дважды в неделю в область скакательного сустава, а титры сыворотки определяли на 21-й день в Antibody Solutions (Санта-Клара, штат Калифорния). Крыс с достаточными титрами сывороточных антител к MARCO человека отбирали для электрослияния для получения гибридом. Две заключительные бустер-инъекции в фосфатно-солевом буфере (PBS) проводили на -3 и -2 дни иммунизации перед сбором.

[0737] *Получение и скрининг гибридом*

[0738] Получение гибридом и скрининговые тесты на антитела к MARCO человека проводили, как описано в **Примере 3**.

[0739] *Связывание клеток*

[0740] Анализы связывания клеток для антител к MARCO человека проводили, как описано в **Примере 3**.

[0741] *Субклонирование и очистка гибридом*

[0742] Субклонирование гибридом и очистку антител к MARCO человека проводили, как описано в **Примере 3**.

[0743] *Генерация последовательностей переменных областей гибридомного антитела*

[0744] Последовательности переменной области гибридомного антитела для человеческих антител к MARCO были созданы, как описано в **Примере 3**.

[0745] *Химерные и гуманизированные антитела*

[0746] Химерные антитела получали путем замены домена Fc крысиного IgG1 или IgG2a человеческими доменами IgG1 или IgG4.

[0747] Гуманизированные антитела были также синтезированы из исходных крысиных гибридом.

[0748] Последовательности VH и VL крысиных гибридом сравнивались с библиотеками известных последовательностей зародышевой линии человека на сайте NCBI (ncbi.nlm.nih.gov/igblast/; Ye, J. et al. Nucleic Acids Research 41:W34-W40 (2013)). Использовали базы данных IMGT генов VH человека (F+ORF, 273 последовательности зародышевой линии) и IMGT генов VLкаппа человека (F+ORF, 74 последовательности зародышевой линии), используемые программой NCBI IgBLAST. Акцепторную зародышевую линию человека выбирали из наиболее близких по последовательности к исходному антителу.

[0749] Человеческая зародышевая линия IGHV1-46 (аллель 1) была выбрана в качестве акцепторной последовательности, а область присоединения человеческой тяжелой цепи IGHJ4 (аллель 1) (J-сегмент гена) была выбрана из человеческих последовательностей области присоединения, собранных на IMGT®, международная информационная система ImMunoGeneTics® по веб-адресу: imgt.org (основатель и директор: Мари-Поль Лефранк, Монпелье, Франция).

[0750] человеческая зародышевая линия IGKV1-39 (аллель 1) была выбрана в качестве акцепторной последовательности, а область присоединения человеческой легкой

цепи IGKJ2 (аллель 1) (ген J) была выбрана из последовательностей присоединяющейся области человека, собранных на IMGT®, международная информационная система ImMunoGeneTics® по веб-адресу: imgt.org (основатель и директор: Мари-Поль Лефранк, Монпелье, Франция). Выравнивание последовательностей исходных и гуманизированных последовательностей VH и VL крыс HX-3061 показано на **Фиг. 17А** и **17В**, соответственно. Выравнивание последовательностей крысиных исходных и гуманизированных последовательностей VL HX-3031 показано на **Фиг. 18**.

[0751] Дополнительные обратные мутации были сделаны в VH гуманизированного антитела, полученном из гибридомы HX-3061, и в VL, полученном из гибридомы HX-3031. Обратные мутации, внесенные в VH HX-3061, представляли собой: V37I, V48I и S49A, основанные на человеческой последовательности VH каркасной области. Обратные мутации, внесенные в VL HX-3031, представляли собой: A13T, A43P, S56D, F71Y, L78M, F83E, и Y87F, основанные на человеческой последовательности VL каркасной области.

[0752] CDR определяли в соответствии с определением AbM (bioinf.org.uk/abs/ для таблицы, в которой сравниваются определения CDR).

[0753] *Кальцийзависимый анализ на основе ИФА*

[0754] Кальцийзависимый анализ на основе ИФА проводили, как описано в **Примере 3**.

[0755] *Кинетика и эпитоп-специфическая сортировка с использованием прибора ProbeLife Gator*

[0756] Анализ кинетики и эпитоп-специфической сортировки вновь созданных антител к MARCO человека проводили, как описано в **Примере 3**.

[0757] *Конкурентный анализ с использованием ЛПНП на рекомбинантном MARCO мыши и человека*

[0758] Конкурентный анализ с использованием ЛПНП на рекомбинантном MARCO мыши и человека проводили, как описано в **Примере 3**.

[0759] *Бактериальный конкурентный анализ MARCO*

[0760] Клетки 293Т, экспрессирующие MARCO человека или мыши, собирали вместе с исходными клетками 293Т. Краситель для оценки жизнеспособности клеток Zombie NIR (BioLegend) готовили путем 1000-кратного разбавления исходного раствора в D-PBS и добавляли к клеткам. Клетки инкубировали с красителем в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте. Реакцию гасили добавлением 1 мл 4x буфера для окрашивания (2% FBS в DBPS, содержащем Ca^{2+}) с последующим центрифугированием при 400xg в течение 5 минут при 4°C. Затем клетки высевали в V-образные 96-луночные планшеты с плотностью 100000 клеток. Бактерии, флуоресцентно меченные A488, (E.coli от Invitrogen), добавляли в количестве 10 мкг/мл с представляющими интерес античеловеческими или антимышиными антителами для 30-минутной инкубации при 37°C. Затем планшеты дважды промывали с последующим ресуспендированием в 100 мкл буфера для окрашивания на проточном цитометре (Attune NxT, Life Technologies). Данные проточной цитометрии анализировали с использованием программного обеспечения

FlowJo (версия 10.6.1), и данные обрабатывали и дополнительно анализировали в программах Microsoft Excel и GraphPad Prism (версия 8).

[0761] **Результаты**

[0762] В результате первичного скрининга антител к MARCO человека на основе ИФА на связывание с MARCO человека было отобрано 304 кандидата. Вторичный скрининг

[0763] 304 антитела-кандидата были идентифицированы в первичном скрининге на основе ИФА с использованием очищенного MARCO человека. Вторичный скрининг связывания с клетками 293Т, экспрессирующими MARCO человека, яванского макака и мыши, или GFP контрольными клетками, позволил выявить 138 кандидатов. Дополнительный вторичный скрининг в отношении связывания SRCR и CLD также проводили с помощью ИФА. Было идентифицировано 90 антител, связывающих SRCR, и 47 антител, связывающих CLD. Затем антитела-кандидаты были проанализированы на предмет связывания на эндогенных клетках, кинетики связывания, конкуренции с ЛПНП и связывания с MSR1 человека. Было идентифицировано 42 антитела-кандидата, 37 антител, связывающих SRCR, и 5 антител, связывающих CLD. Из них было выявлено 11 антител-кандидатов к MARCO человека с хорошими характеристиками связывания. Последовательности выбранных антител к MARCO человека показаны в таблице перечня последовательностей. CDR определены с использованием определения AbM.

[0764] Характеристика образованных крысиной гибридомой антител к MARCO человека показана в **таблице 3**.

мкАг к huMARCO	Изотип	Группа	Ca ²⁺ /Mg ²⁺ необходимые для связывания	K _{on} (1/Мс)	K _{off} (1/с)	EC ₅₀ для 293Т с белком человека (HuMARCO) (нМ)	EC ₅₀ для 293Т с белком яванского макака (SuMARCO) (нМ)	EC ₅₀ для конкурентного анализа с использованием ЛПНП (нМ)	Связывание MSR1
PI-NX-3011	Крысиный IgG2a	3	+	4,01E+05	9,14 E-04	0,096	0,094	Н/Д	-
PI-NX-3023	Крысиный IgG2a	2	+/-	2,27E+05	4,75 E-04	0,451	0,071	1,5	-
PI-NX-	Крыси	2	+	2,42E+	6,01	0,23	0,162	1,3	-

3026	ный IgG2a			05	E-04				
PI-NX-3028	Крыси ный IgG2a	2	+/-	2,42E+ 05	4,79 E-04	0,332	0,144	1,5	-
PI-NX-3031	Крыси ный IgG2a	3	+	4,43E+ 05	7,98 E-04	0,141	0,046	Н/Д	-
PI-NX-3033	Крыси ный IgG2a	2	+	2,70E+ 05	8,07 E-04	0,272	0,067	Н/Д	-
PI-NX-3040	Крыси ный IgG2a	3	+	2,41E+ 05	6,72 E-04	0,229	0,107	2,9	-
PI-NX-3041	Крыси ный IgG2a	3	+	3,08E+ 05	7,96 E-04	0,215	0,110	Н/Д	-
PI-NX-3043	Крыси ный IgG2a	3	+	2,33E+ 05	8,49 E-04	0,438	0,067	3,4	-
PI-NX-3047	Крыси ный IgG2a	1	-	4,84E+ 05	6,55 E-04	0,326	0,100	Н/Д	-
PI-NX-3061	Крыси ный IgG2a	4	-			0,49	0,45	8,2	-

[0765] Пять из одиннадцати антител-кандидатов к MARCO были отобраны для дальнейшей разработки на основе анализа последовательности CDR: PI-NX-3011, PI-NX-3031, PI-NX-3043, PI-NX-3061, и PI-NX-3092. Человеческий химерные антитела получали путем замены области Fc крысиного IgG2a областью Fc человеческого IgG1 (для PI-NX-3011 и PI-NX-3043) или IgG1 и IgG4 (для PI-3031 и PI-NX-3061). Дополнительные химерные антитела также получали путем замены области Fc IgG2a крысы на область Fc IgG2a мыши (для PI-NX-3036 и PI-NX-3092). Дальнейшую гуманизацию каркасных областей VH и VL проводили на антителах, полученных из крысиных исходных антител PI-NX-3011, PI-NX-3031 и PI-NX-3061.

[0766] В таблице 4 представлены сводные данные о выбранных крысиных исходных антителах, химерных антителах и созданных гуманизированных антителах.

Таблица 4			SEQ ID NO:
Название	Измененное название (если необходимо)	Описание	
PI-NX-3031		исходная крысиная гибридома	1-10
PI-3010-AB	PI-3010	hIgG1/ химерное PI-NX- 3031	11-20
PI-3011-AB	PI-3010.11	гуманизированное PI-NX- 3031/3031-1 hIgG1	21-30
PI-3012-AB	PI-3010.12	гуманизированное PI-NX- 3031/3031-2 hIgG1	31-40
PI-3013-AB	PI-3010.13	гуманизированное PI-NX- 3031/3031-3 hIgG1	41-50
PI-3014-AB	PI-3010.14	гуманизированное PI-NX- 3031/3031-4 hIgG1	51-60
PI-3015-AB	PI-3010.15	гуманизированное PI-NX- 3031/3031-5 hIgG1	61-70
PI-3020-AB	PI-3010.20	химерное PI-NX- 3031 - hIgG4	71-80
PI-3022-AB	PI-3010.22	гуманизированное PI-NX- 3031/3031-2 hIgG1	81-90
PI-3023-AB	PI-3010.23	гуманизированное PI-NX- 3031/3031-2 hIgG1	91-100
PI-3024-AB	PI-3010.24	гуманизированное PI-NX- 3031/3031-2 hIgG1	101-110
PI-3025-AB	PI-3010.25	гуманизированное PI-NX- 3031/3031-2 hIgG1	434-443
PI-3026-AB	PI-3010.26	гуманизированное PI-NX- 3031/3031-2 hIgG1	121-130
PI-3027-AB	PI-3010.27	гуманизированное PI-NX- 3031/3031-2 hIgG1	131-140
PI-3046-AB	PI-3010.46	гуманизированное PI-NX- 3031/3031-2 hIgG4	474-483

PI-3048-AB	PI-3010.48	гуманизированное PI-НХ- 3031/3031-2 hIgG4	444-453
PI-НХ-3061		исходная крысиная гибридома	141-150
PI-3016-AB		гуманизированное PI-НХ- 3061/3061-1 hIgG1	151-160
PI-3017-AB		гуманизированное PI-НХ- 3061/3061-2 hIgG1	161-170
PI-3018-AB		гуманизированное PI-НХ- 3061/3061-3 hIgG1	171-180
PI-3019-AB		Химерное антитело PI-НХ-3061 mIgG2a	181-190
PI-3028-AB		Химерное антитело PI-НХ-3061 hIgG1	191-200
PI-3029-AB		Химерное антитело PI-НХ-3061 hIgG4	201-210
PI-3032-AB		гуманизированное PI-НХ- 3061/3061-2 hIgG1	211-220
PI-3033-AB		гуманизированное PI-НХ- 3061/3061-2 hIgG1	221-230
PI-НХ-3011		исходная крысиная гибридома	231-240
PI-3030-AB	PI-3030	Химерное антитело НХ3011-h1 hIgG1	241-250
PI-3036-AB	PI-3030.36	гуманизированное PI-НХ- 3011/3011-1 hIgG1	311-320
PI-3037-AB	PI-3030.37	гуманизированное PI-НХ- 3011/3011-2 hIgG1	321-330
PI-3038-AB	PI-3030.38	гуманизированное PI-НХ- 3011/3011-3 hIgG1	331-340
PI-3039-AB	PI-3030.39	гуманизированное PI-НХ- 3011/3011-4 hIgG1	341-350
PI-3040-AB	PI-3030.40	гуманизированное PI-НХ- 3011/3011-5 hIgG1	351-360
PI-3041-AB	PI-3030.41	гуманизированное PI-НХ- 3011/3011-5 hIgG1	454-463
PI-3047-AB	PI-3030.47	гуманизированное PI-НХ- 3011/3011-5	464-473

		hIgG4	
PI-HX-3043		исходная крысиная гибридома	251-260
PI-3031-AB		Химерное антитело HX3043-h1 hIgG1	261-270
PI-HX-3092		исходная крысиная гибридома	361-370
PI-3035		HX3092 (мутация А) - mIgG2a	371-380

[0767] Вновь образованные крысиной гибридомой антитела к MARCO человека характеризовали, как описано ранее. Характеристика крысиных исходных антител HX-3031 и HX-3061 показана в **таблице 5**. Ни одно антитело не связывалось с MSR1. Кинетику связывания определяли с помощью многоциклового кинетического анализа с использованием антигена huMARCO, как описано ранее.

Таблица 5										
МкАт к huMARCO	Группа	Са2+ /Mg2+ необходимые для связывания	EC ₅₀ (гаIgG2a) ИФА (hu/SRCR/суп)	К _д (М) Человек	К _д (М) Яванский макак	EC ₅₀ для 293Т с белком человека (Hu MARCO) (нМ)	EC ₅₀ для 293Т с белком яванского макака (Cu MARCO) (нМ)	EC ₅₀ для 293Т с белком мыши (Mu MARCO) (нМ)	EC ₅₀ для бактериального конкурентного анализа (нМ)	EC ₅₀ для конкурентного анализа с использованием ЛППП (нМ)
PI-HX-3031	3	+	0,13/ 0,15/ 0,14	9,13 E-11	1,09E -10	0,56	0,51	н/с	0,18	6,2
PI-HX-3061	4	-	0,24/ 0,24/ 0,23	2,56 E-10	1,19E -10	0,49	0,45	1,52	0,52	8,2

[0768] Было определено, что одно антитело к huMARCO (PI-HX-3061) перекрестно реагирует с MARCO человека и мыши.

[0769] Три антитела, два антитела к MARCO мыши, PI-3008 и PI-3009, и перекрестно реагирующее антитело к MARCO человека PI-HX-3061, были дополнительно охарактеризованы в анализе бактериального связывания. Как показано на **Фиг. 19**,

инкубация клеток muMARCO 293T с возрастающими концентрациями каждого из PI-3008, PI-3009 или PI-NX-3061 приводила к снижению бактериального связывания дозозависимым образом, в то время как инкубация с изотипическими контролями крысиным IgG1 или мышинным IgG2a не влияла на связывание бактерий с клетками.

[0770] Сравнение физических свойств PI-3008, PI-3009 и PI-NX-3061 представлено в таблице 6.

МкАт к muMARCO	Мышиная группа	Ca ²⁺ /Mg ²⁺ необходимые для связывания	К _d по Biacore (нМ)	ЕС ₅₀ для 293Т с белком мыши (muMARCO) (нМ)	ЕС ₅₀ для бактериального конкурентного анализа (нМ)	Связывание MSRI	Связывание с BMDM	Связывание с TAM in vivo
PI-3008	2	Есть	<0,02	1,097	1,81	-	+	+
PI-3009	4	Есть	<0,02	TBD	3,84	-	+	+
PI-NX-3061 (перекрестно-реактивное)	5	Отсутствует	<0,02	2,526	0,85	-	+	TBD

[0771] Скрининг на основе ИФА выбранных исходных антител, продуцируемых крысиной гибридомой, с 4 концентрациями ЭДТА на рекомбинантном человеческом MARCO показал дифференциальную зависимость связывания MARCO с различными антителами к MARCO и разными эпитопами от двухвалентных катионов. Результаты представлены в Таблице 7.

	ID клона	ЭДТА [конц.]			
		0	2мМ	10мМ	50мМ
SRCR	PI-NX-3010	0,9525	0,8158	0,101	0,1055
	PI-NX-3011	1,1743	0,0636	0,0811	0,082
	PI-NX-3047	0,9688	1,2065	0,9205	0,9986
	PI-NX-3031	1,3709	0,0678	0,0589	0,0754
	PI-NX-3043	1,1971	0,0595	0,06	0,1002
CLD	PI-NX-3049	1,1909	1,1447	1,0708	1,1915
	PI-NX-3048	1,1987	1,2159	1,0695	1,2002

[0772] Отобранные человеческие химерные антитела и дополнительные гуманизированные антитела также характеризовали в отношении видовой специфичности связывания, потребности в двухвалентных катионах в связывании, кинетики связывания доменов SRCR и CLD и связывания клеток.

[0773] Как показано на **Фиг. 52** показано, что связывание некоторых антител к MARCO с MARCO зависело от кальция. Добавление 2 мМ ЭДТА приводило к устранению связывания PI-3010.15, PI-3010.25 и PI-3030.41 с MARCO, в то время как связывание независимого от кальция мкАт, PI-3032, не изменялось. Суррогатное мкАт к MARCO мыши, PI-3008-AB, также связывалось с MARCO мыши зависимым от кальция образом. Добавление 2 мМ ЭДТА приводило к устранению связывания, в то время как связывание независимого от кальция мкАт к MARCO мыши, PI-3000, не изменялось.

[0774] Сводка результатов определения характеристик PI-3010 (hIgG1), PI-3030 (hIgG1) и PI-3031 (hIgG1) представлена в **таблице 8**.

Таблица 8									
мкАт к huMARCO	Специфичность	Ca ²⁺ зависимое связывание	K _D (нМ) Человек	K _D (нМ) Яванский макак	K _{off} (1/с) ProbeLife	EC ₅₀ (нМ) OVX, Человек	EC ₅₀ (нМ) OVX HuSRCR-мышинный CLD	EC ₅₀ (нМ) OVX, Яванский макак	Связывание с PBL
PI-3010-AB (hIgG1)	hu/su	Есть	0,43-0,64	0,26	2,34E-03	0,68	0,25	0,34	Отсутствует
PI-3030-AB (hIgG1)	hu/su	Есть	0,44	Н.О.	3,51E-03	0,55	0,17	0,38	Отсутствует
PI-3031-AB (hIgG1)	hu/su	Есть	0,60	Н.О.	2,81E-03	1,6	1,071	1,092	Отсутствует

[0775] Результаты для химерного антитела PI-3031 (hIgG1) и еще двух гуманизированных антител на основе химерного антитела PI-3031 показаны в **таблице 9**.

Таблица 9									
мкАт	Эпи топ SR CR	Ca ²⁺ зави сим.	EC ₅₀ (raIgG2a) ИФА (hu/SRCR/суп)	К _D (М; пк) Человек	К _D (М; пк) Яванский макак	EC ₅₀ (нМ) OVX Человек	EC ₅₀ (нМ) OVX Яванский макак	EC ₅₀ для бактерий (нМ) Клеточный	Связывание MS R1
PI-3031-chi (PI-3010)	Группа 3	Есть	0,04/0,12/0,07	4,30E-10	2,59E-10	0,68	1,48	0,44	-
PI-3031-h2 (PI-3012)	Группа 3	Есть	0,08/0,27/0,07	1,13E-09	7,35E-10	0,57	1,40	0,12	-
PI-3031-h5 (PI-3015)	Группа 3	Есть	[0047] 0,08/0,25/0,09	9,11E-10	6,11E-10	0,86	1,73	0,50	

[0776] Химерные антитела PI-3010, PI-3030 и PI-3031 также оценивали на связывание с PBL. Как показано на **Фиг. 20А**, химерные антитела связывались с клетками 293Т, сверхэкспрессирующими MARCO, но не с иммунными клетками, присутствующими в PBL. Связывание с эозинофилами было неспецифическим для всех протестированных антител, включая изотипический контроль hIgG1. PI-3010 показано слева, PI-3030 показано слева посередине, PI-3031 показано справа посередине, а изотипический контроль hIgG1 показан справа. Также оценивали связывание PI-NX-3031 с иммунными клетками из рака эндометрия (первичная опухоль человека). Как показано на **Фиг. 20В**, антитело связывалось с TAM и моноцитами из образца опухоли. Связывание антитела - правый пик, связывание изотипического контроля - левый пик.

Пример 6. Картирование эпитопов путем замены поверхностных остатков

[0777] Материалы и способы

[0778] Кристаллическую структуру SRCR MARCO мыши (запись PDB 2OY3) использовали для разработки конструкций. Мышиные и человеческие последовательности SRCR MARCO выравнивали, а различные остатки на поверхности белка заменяли в кластерах. N-концевую His-метку и домен CLD добавляли к последовательностям SRCR для получения рекомбинантных белков. Последовательности рекомбинантных белков, использованных в этих исследованиях, перечислены ниже. Остатки, выделенные жирным шрифтом и подчеркнутые, представляют собой замененные остатки эпитопа:

[0779] hMARCO(His-CLD-SRCR) (RG3033)

[780]

ННННННННКGEQGAPGLQGHKGMMPGAPGPPGPPAЕКGAKGAMGRDGATGPSGPQG

PPGVKGEAGLQGPQGAPGKQGATGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPKGETGTKGEKGDGLGL
 PGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKGDGFRPGPPGLAGFPGAKGDQGPGLQGVVPGP
 PGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPGSPGSPGATGLKGSKGDGTLQGGQGRKGESGVP
 GPAGVKGEQGSPLAGPKGAPGQAGQKGDQGVKGSSEGEQGVKGEKGERGENSVSVRI
 VGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDEWQNSDAIVFCRMLGYSKGRALYKVGAGTGQIWL
 DNVQCRGTESTLWSCTKNSWGHDCSHEEDAGVECSV*

[0105] hVar1 (RG3034)

[0106]

HHHHHHKGEQGAPGLQGHKGAMGMPGAPGPPGPPAEKGAKGAMGRDGATGPSGPQG
 PPGVKGEAGLQGPQGAPGKQGATGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPKGETGTKGEKGDGLGL
 PGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKGDGFRPGPPGLAGFPGAKGDQGPGLQGVVPGP
 PGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPGSPGSPGATGLKGSKGDGTLQGGQGRKGESGVP
 GPAGVKGEQGSPLAGPKGAPGQAGQKGDQGVKGSSEGEQGVKGEKGERGENSVSVRI
 VGSSNRGRAEVYYNNEWGTICDDEWQNSDAIVFCRMLGYSKGRALYKVGAGTGQIWL
 DNVQCRGTESTLWSCTKNSWGHDCSHEEDAGVECSV*

[0107] hVar2 (RG3035)

[0108]

HHHHHHKGEQGAPGLQGHKGAMGMPGAPGPPGPPAEKGAKGAMGRDGATGPSGPQG
 PPGVKGEAGLQGPQGAPGKQGATGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPKGETGTKGEKGDGLGL
 PGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKGDGFRPGPPGLAGFPGAKGDQGPGLQGVVPGP
 PGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPGSPGSPGATGLKGSKGDGTLQGGQGRKGESGVP
 GPAGVKGEQGSPLAGPKGAPGQAGQKGDQGVKGSSEGEQGVKGEKGERGENSVSVRI
 VGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDDWDNNDAIVFCRMLGYSGRALYKVGAGTGQIWL
 DNVQCRGTESTLWSCTKNSWGHDCSHEEDAGVECSV*

[0109] hVar3 (RG3036)

[0110]

HHHHHHKGEQGAPGLQGHKGAMGMPGAPGPPGPPAEKGAKGAMGRDGATGPSGPQG
 PPGVKGEAGLQGPQGAPGKQGATGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPKGETGTKGEKGDGLGL
 PGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKGDGFRPGPPGLAGFPGAKGDQGPGLQGVVPGP
 PGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPGSPGSPGATGLKGSKGDGTLQGGQGRKGESGVP
 GPAGVKGEQGSPLAGPKGAPGQAGQKGDQGVKGSSEGEQGVKGEKGERGENSVSVRI
 VGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDEWDNSDAIVFCRMLGYSKGRALSSVGAGTGQIWL
 DNVQCRGTESTLWSCTKNSWGHDCSHEEDAGVECSV*

[0111] hVar4 (RG3037)

[0112]

HHHHHHKGEQGAPGLQGHKGAMGMPGAPGPPGPPAEKGAKGAMGRDGATGPSGPQG
 PPGVKGEAGLQGPQGAPGKQGATGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPKGETGTKGEKGDGLGL
 PGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKGDGFRPGPPGLAGFPGAKGDQGPGLQGVVPGP
 PGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPGSPGSPGATGLKGSKGDGTLQGGQGRKGESGVP
 GPAGVKGEQGSPLAGPKGAPGQAGQKGDQGVKGSSEGEQGVKGEKGERGENSVSVRI

VGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDEWQNSDAIVFCRMLGYSKGRALYKVGAGTGQIWL
DNVQCRGTENNSLWDCSKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV*

[0113] hVar5 (RG3038)

[0114]

HHHHHHKGEQGAPGLQGHKGAMGMPGAPGPPGPPAEKGAKGAMGRDGATGPSGPQG
PPGVKGEAGLQGPQGAPGKQGATGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPKGETGTKGEKGDGLL
PGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKGDGFRPGPPGLAGFPGAKGDQGPGLQGVPGP
PGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPGSPGSPGATGLKGSKGDGTLQGGQGRKGESGVP
GPAGVKGEQGSPLAGPKGAPGQAGQKGDQGVKGSSEGEQGVKGEKGERGENSVSVRI
VGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDEWQNSDAIVFCRMLGYSKGRALYKVGAGTGQIWL
DNVQCRGTESLWSTKNSWGNNHNCVHNEDAGVECSV*

[0115] hVar6 (RG3039)

[0116]

HHHHHHKGEQGAPGLQGHKGAMGMPGAPGPPGPPAEKGAKGAMGRDGATGPSGPQG
PPGVKGEAGLQGPQGAPGKQGATGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPKGETGTKGEKGDGLL
PGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKGDGFRPGPPGLAGFPGAKGDQGPGLQGVPGP
PGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPGSPGSPGATGLKGSKGDGTLQGGQGRKGESGVP
GPAGVKGEQGSPLAGPKGAPGQAGQKGDQGVKGSSEGEQGVKGEKGERGENSVSVRI
VGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDDWDNSDAIVFCRMLGYSKGRALYKVGAGTGQIWL
DNVNCRGTESLWSCSSKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV*

[0117] hVar7 (RG3040)

[0118]

HHHHHHKGEQGAPGLQGHKGAMGMPGAPGPPGPPAEKGAKGAMGRDGATGPSGPQG
PPGVKGEAGLQGPQGAPGKQGATGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPKGETGTKGEKGDGLL
PGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKGDGFRPGPPGLAGFPGAKGDQGPGLQGVPGP
PGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPGSPGSPGATGLKGSKGDGTLQGGQGRKGESGVP
GPAGVKGEQGSPLAGPKGAPGQAGQKGDQGVKGSSEGEQGVKGEKGERGESFORVRI
VGGTNRGRAEVYYSGTWGTICDDEWQNSDAIVFCRMLGYSKGRALYKVGAGTGQIWL
DNVQCRGTESLWSTKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV*

[0119] mMARCO (RG3016)

[0120]

HHHHHHHHGERGSPGPKGAPGAPGIPGLPGPAAEKGEKGAAGRDTGPGVQGPQGPPGS
KGEAGLQGLTGAPGKQGATGAPGRGEKGSKGDIGLTGPKGEHGTGDKGDLGLPGN
KGDMMGMKGDGTPMGSPGAQGGKGDAGKPGLPGLAGSPGVKGDQGKPGVQGVPGPQG
APGLSGAKGEPGRTGLPGPAGPPGIAGNPPIAGVKGSKGDGIGQGGQKGTGKESGVPGLV
GRKGDGTPGLAGPKGEPGRVGQKGDPMKGSQGGQKGEKGGKGESFQVRIMGG
TNRGRAEVYYNNEWGTICDDDWDNNDATVFCRMLGYSRGRALSSYGGGSGNIWLDN
VNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS

[0121] mVar1 (RG3026)

[0122]

HHHHHHHHGERGSPGPKGAPGAPGIPGLPGPAAEKGEKGAAGRDTGTPGVQGPQGP
 KGEAGLQGLTGAPGKQGATGAPGPRGEKGSKGDIGLTGPKGEHGTGDKGDLGLPGN
 KGDMGMKGDGTGPMGSPGAQGGKGDAGKPGLPGLAGSPGVKGDQGKPGVQGVPGPQ
 APGLSGAKGEPGRTGLPGPAGPPGIAGNPGIAGVKGSKGDTGIQGQKGTGKESGVPGLV
 GRKGDGTSPGLAGPKGEPGRVGQKGDPMKGSQGGQKGEKQKGESFQVRIMGG
 TNRGRAEVYYSGTWGTCDDDDWDNNDATVFCRMLGYSRGRALSSYGGGSGNIWLDN
 VNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS*

[0123] mVar2 (RG3027)

[0124]

HHHHHHHHGERGSPGPKGAPGAPGIPGLPGPAAEKGEKGAAGRDTGTPGVQGPQGP
 KGEAGLQGLTGAPGKQGATGAPGPRGEKGSKGDIGLTGPKGEHGTGDKGDLGLPGN
 KGDMGMKGDGTGPMGSPGAQGGKGDAGKPGLPGLAGSPGVKGDQGKPGVQGVPGPQ
 APGLSGAKGEPGRTGLPGPAGPPGIAGNPGIAGVKGSKGDTGIQGQKGTGKESGVPGLV
 GRKGDGTSPGLAGPKGEPGRVGQKGDPMKGSQGGQKGEKQKGESFQVRIMGG
 TNRGRAEVYYNNEWGTICDDEWQNSDATVFCRMLGYSKGRALSSYGGGSGNIWLDN
 VNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS*

[0125] mVar3 (RG3028)

[0126]

HHHHHHHHGERGSPGPKGAPGAPGIPGLPGPAAEKGEKGAAGRDTGTPGVQGPQGP
 KGEAGLQGLTGAPGKQGATGAPGPRGEKGSKGDIGLTGPKGEHGTGDKGDLGLPGN
 KGDMGMKGDGTGPMGSPGAQGGKGDAGKPGLPGLAGSPGVKGDQGKPGVQGVPGPQ
 APGLSGAKGEPGRTGLPGPAGPPGIAGNPGIAGVKGSKGDTGIQGQKGTGKESGVPGLV
 GRKGDGTSPGLAGPKGEPGRVGQKGDPMKGSQGGQKGEKQKGESFQVRIMGG
 TNRGRAEVYYNNEWGTICDDDDWQNNDATVFCRMLGYSRGRALYKYGGGSGNIWLDN
 VNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS*

[0127] mVar4 (RG3029)

[0128]

HHHHHHHHGERGSPGPKGAPGAPGIPGLPGPAAEKGEKGAAGRDTGTPGVQGPQGP
 KGEAGLQGLTGAPGKQGATGAPGPRGEKGSKGDIGLTGPKGEHGTGDKGDLGLPGN
 KGDMGMKGDGTGPMGSPGAQGGKGDAGKPGLPGLAGSPGVKGDQGKPGVQGVPGPQ
 APGLSGAKGEPGRTGLPGPAGPPGIAGNPGIAGVKGSKGDTGIQGQKGTGKESGVPGLV
 GRKGDGTSPGLAGPKGEPGRVGQKGDPMKGSQGGQKGEKQKGESFQVRIMGG
 TNRGRAEVYYNNEWGTICDDDDWDNNDATVFCRMLGYSRGRALSSYGGGSGNIWLDN
 VNCRGTESTLWSCTKNNSWGNHNCVHNEDAGVECS*

[0129] mVar5 (RG3030)

[0130]

HHHHHHHHGERGSPGPKGAPGAPGIPGLPGPAAEKGEKGAAGRDTGTPGVQGPQGP
 KGEAGLQGLTGAPGKQGATGAPGPRGEKGSKGDIGLTGPKGEHGTGDKGDLGLPGN
 KGDMGMKGDGTGPMGSPGAQGGKGDAGKPGLPGLAGSPGVKGDQGKPGVQGVPGPQ

APGLSGAKGEPGRTGLPGPAGPPGIAGNPGIAGVKGSKGDTGIQGQKGTKGESGVPGLV
GRKGDGTSPGLAGPKGEPGRVGQKGDPMKGSSGQQGQKGEKQKGESFQVRIMGG
TNRGRAEVYYNNEWGTICDDDWDNNDATVFCRMLGYSRGRALSSYGGGSGNIWLDN
VNCRGTENSLWDCSKNSWGHHDCSHEEDAGVECS*

[0131] mVar6 (RG3031)

[0132]

HHHHHHHHGERGSPGPKGAPGAPGIPGLPGPAAEKGEKGAAGRDTGTPGVQGPQGP
KGEAGLQGLTGAPGKQGATGAPGPRGEKGSKGDIGLTGPKGEHGTKGDKGDLGLPGN
KGDMGMKGDTGPMGSPGAQGGKGDAGKPGLPGLAGSPGVKGDQGKPGVQGVQGPQ
APGLSGAKGEPGRTGLPGPAGPPGIAGNPGIAGVKGSKGDTGIQGQKGTKGESGVPGLV
GRKGDGTSPGLAGPKGEPGRVGQKGDPMKGSSGQQGQKGEKQKGESFQVRIMGG
TNRGRAEVYYNNEWGTICDDEWQNNDATVFCRMLGYSRGRALSSYGGGSGNIWLDN
VQCRGTENSLWDCTKNSWGNHNCVHNEDAGVECS*

[0133] mVar7 (RG3032)

[0134]

HHHHHHHHGERGSPGPKGAPGAPGIPGLPGPAAEKGEKGAAGRDTGTPGVQGPQGP
KGEAGLQGLTGAPGKQGATGAPGPRGEKGSKGDIGLTGPKGEHGTKGDKGDLGLPGN
KGDMGMKGDTGPMGSPGAQGGKGDAGKPGLPGLAGSPGVKGDQGKPGVQGVQGPQ
APGLSGAKGEPGRTGLPGPAGPPGIAGNPGIAGVKGSKGDTGIQGQKGTKGESGVPGLV
GRKGDGTSPGLAGPKGEPGRVGQKGDPMKGSSGQQGQKGEKQKGENSVSVVRIMGS
SNRGRAEVYYNNEWGTICDDDWDNNDATVFCRMLGYSRGRALSSYGGGSGNIWLDN
VNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS*

[0135] Сравнения человеческих и мышинных последовательностей домена SRCR дикого типа и полученных вариантов мышинных и человеческих последовательностей показаны на **Фиг. 21**.

[0136] *Кинетика связывания с применением прибора ProbeLife Gator*

[0137] Не содержащую меток систему Probe-Life Gator™ использовали для анализа связывания лучших античеловеческих и антимышиных антител с вариантами антигена SRCR мыши/человека.

[0138] В кинетическом анализе использовали зонды к Fc мыши или Fc человека для захвата антител к MARCO на зонде, а затем использовали пятистадийный протокол кинетического анализа для измерения аффинности антител к разным вариантам антигенов, описанных выше, включая следующие стадии: исходный уровень, загрузка, исходный уровень, ассоциация и диссоциация. Буфер для кинетических исследований (К-буфер), предоставленный ProbeLife, использовали для установления исходного уровня в течение 60 секунд, а затем зонды к mFc или к hFc загружались 200 нМ антител на 120 с, пока захват не достигал насыщения, измерение исходного уровня в К-буфере проводили еще 60 с, после чего следовала стадия ассоциации с использованием 200 нМ антигена (варианты SRCR MARCO человека и варианты SRCR MARCO мыши), а стадию

диссоциации выполняли в К-буфере в течение 5-10 минут. Анализ проводили при 37°C, чтобы максимизировать диссоциацию антител: антиген.

[0139] Для загрузки использовали антитела PI-3010, PI-3008, PI-3019, PI-3030, PI-3031 и PI-3035. PI-3008, PI-3010 и PI-3030 являются Ca²⁺-зависимыми связывающими веществами, тогда как PI-3019 и PI-3035 являются независимыми от Ca²⁺ связывающими веществами. PI-3019 и PI-3035 также обладают перекрестной реактивностью с MARCO как человека, так и мыши.

[0140] Результаты

[0141] На связывание PI-3008 с mMARCO больше всего влияли мутации в mVar2, mVar 3, mVar 4, mVar, 5 и mVar6 (данные не показаны). Однако на связывание PI-3008 с SRCR mMARCO больше всего повлияли мутации в mVar6, и, таким образом, измененные остатки в mVar6, вероятно, являются частью эпитопа mMARCO (D450, D452, N487, S499 MARCO мыши). Мутации в mVar 1 и mVar 7 оказывали минимальный нежелательный эффект на связывание PI-3008 с mMARCO. Сравнение последовательности домена SRCR mMARCO дикого типа (ДТ) и последовательности mVar6 показано на **Фиг. 22**.

[0142] Перекрестно-реактивные антитела с Ca²⁺-независимым связыванием, PI-3019 и PI-3035, были протестированы как с мышинными, так и с человеческими вариантами MARCO. На PI-3019 наиболее неблагоприятно влияли мутации в hVar3 (Q452D, Y472S и K473S MARCO человека), в то время как на PI-3035 неблагоприятно влияли hVar5 и hVar6 (данные не показаны). Аналогичное снижение связывания наблюдалось с mVar3 для PI-3019 и mVar 3 и mVar 5 для PI-3035. Сравнение последовательностей домена SRCR hMARCO дикого типа (ДТ) и последовательностей hVar3, hVar5 и hVar6 показано на **Фиг. 22**. Выделенные жирным шрифтом и подчеркнутые аминокислоты подверглись мутированию по сравнению с диким типом MARCO человека или мыши.

[0143] Только человеческие и Ca²⁺-зависимые антитела PI-3010, PI-3030 и PI-3031 показали значительно сниженное связывание с hVar3 (данные не показаны). Таким образом, hVar3 влиял на связывание PI-3010, PI-3030, PI-3031 и PI-3019, тогда как hVar5 и hVar6 влияли на связывание PI-3035.

[0144] Сводная информация о связывании антител и зависимости от катионов представлена в **таблице 10**.

Таблица 10			
Антитело	Вариант с уменьшенным связыванием	Связывание для видов	Ca ²⁺ -зависимое?
PI-3010 (HX-3031)	hVar3	Человек/Яванский макак	+
PI-3030 (HX-3011)	hVar3	Человек/Яванский макак	+

PI-3033 (HX-3043)	hVar3	Человек/Яванский макак	+
PI-3019 (HX-3061)	hVar3	Человек/Яванский макак /Мышь	- (независимое)
PI-3035 (HX-3092)	hVar5, hVar6	Человек/Яванский макак /Мышь	- (независимое)
PI-3008	mVar6	Мышь	+

[0145] Связывание различных человеческих антител с hVar3, измеренное с помощью ИФА, показано на **Фиг. 23**. hIgG1 и mIgG2a использовали в качестве контролей антител. PI-3008 и PI-300 использовали в качестве отрицательного контроля. Антитела с одиночной реактивностью к MARCO человека (PI-3010, PI-3020, PI-3030, PI-3031) не связывались с hVar3, в то время как антитела, полученные из перекрестно-реактивной гибридомы HX-3061 (PI-3028, PI-3029, PI-319) или HX-3092 (PI-3035), связанные с hVar3.

[0146] Для подтверждения важности остатков, идентифицированных в hVar3 (Q452, Y472 и K473), в качестве связывающего эпитопа для одиночных реактивных антител к hMARCO, PI-3010 был связан как с hVar3, который имеет мутантные остатки Q452D, Y472S и K473S, так и с mVar3, который имеет те же остатки, что и человеческий MARCO дикого типа, Q452, Y472 и K473. Связывание PI-3010 было нарушено на hVar3, но восстановлено на mVar3 (данные не показаны). Это подтвердило, что по меньшей мере один, некоторые или все остатки Q452, Y472 и K473, вероятно, являются частью эпитопа MARCO для антител, образуемых против человеческого MARCO, полученных из HX-3011, HX-3043, HX-3031 и HX-3061 (например, включая, помимо прочего, PI-3010, PI-3020, PI-3030, PI-3031, PI-3019 и PI-3033). Эти остатки также находятся рядом с кислым кластером D447 D448 E511 на MARCO.

[0147] Остатки, которые были мутированы в hVar5, влияющие на связывание PI-3035, представляли собой H505, D507, S509 и E511. Остатки, которые были мутированы в hVar6, влияющие на связывание PI-3035, представляли собой E450, Q452, Q487 и T499. Таким образом, по меньшей мере один, некоторые или все остатки E450, Q452, Q487, T499, H505, D507, S509 и E511, вероятно, представляют собой другой связывающий эпитоп для антител, полученных из HX-3092 (например, тех, которые включают, но не ограничиваются, PI-3035).

[0148] Антитела мыши и человека имеют перекрывающиеся эпитопы в домене SRCR с одним перекрывающимся остатком, Q452 для SRCR человека и D452 для SRCR мыши, как показано на **Фиг. 24**. Перекрывающийся остаток обведен как в домене SRCR мыши слева, так и в домене SRCR человека справа.

Пример 7: Исследование фармакокинетики отличных от человека приматов

[0149] Для оценки экспозиции лекарственного средства и безопасности гуманизированных лекарственных средств-кандидатов были разработаны два фармакокинетических (ФК) анализа - общий и свободный (связывание лиганда) - для

количественного определения концентрации антител PI-3025-AB2 (формат IgG1) и PI-3048-AB (формат IgG4) в поисковом исследовании ФК и переносимости у отличных от человека приматов (NHP) с однократным введением дозы. Исследование с однократным введением дозы включало четырех животных (1 самца и 1 самку в группе), которым вводили 10 мг/кг PI-3025-AB2 (IgG1) и PI-3048-AB (IgG4). В **таблице 11** представлен дизайн исследования.

Таблица 11						
Группа	Тестируемый материал	Уровень дозы (мг/кг)	Объем дозы (мл/кг)	Конц. дозы (мг/мл)	Кол-во животных	
					Самцы	Самки
1	Контрольное соединение	0	2	0	1	1
2	PI-3025-AB2	10	2	5	1	1
3	PI-3048-AB	10	2	5	1	1

[0150] Анализ связывания лиганда

[0151] Стандартный планшет MSD (Meso Scale Discovery, кат. № L15XA-3) покрывали рекомбинантным человеческим белком MARCO в концентрации 1 мкг/мл. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин, а затем промывали. Затем планшет блокировали 5% бычьим сывороточным альбумином (BSA) на 60 мин при комнатной температуре.

[0152] Белковые стандарты PI-3025-AB2 и PI-3048-AB и образцы для контроля качества, а также образцы животных разводили в буфере (PBS/0,5% BSA/0,05% Tween+Ca²⁺/Mg²⁺) и добавляли в планшет с покрытием в солевом буфере. Планшет инкубировали 60 мин при комнатной температуре и промывали. Добавляли 0,5 мкг/мл детектирующего антитела к CH2 IgG человека (Thermo Fisher, кат. № MA5-16929) и планшет инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре. Планшет промывали и в планшет MSD добавляли 1x буфер для считывания (Meso Scale Discovery, кат. № R92TC-1). Планшет считывали на MSD Sector Imager.

[0153] Формат общего ФК анализа

[0154] Покрытый стрептавидином планшет MSD (Meso Scale Discovery, кат. № L15SA-1) покрывали биотинилированным антителом к каппа-цепи человека (Invitrogen, кат. № SA1-19155) в концентрации 1 мкг/мл. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин, а затем промывали. Белковые стандарты PI-3025-AB2 и PI-3048-AB и образцы для контроля качества, а также образцы животных разводили в буфере (PBS/0,5% BSA/0,05% Tween+Ca²⁺/Mg²⁺) и добавляли в планшет с покрытием в солевом буфере. Планшет инкубировали 60 мин при комнатной температуре и промывали. Добавляли 0,5 мкг/мл детектирующего антитела к CH2 IgG человека (Thermo Fisher, кат. № MA5-16929) и планшет инкубировали в течение 60 минут при комнатной температуре.

Планшет промывали и в планшет MSD добавляли 1х буфер для считывания (Meso Scale Discovery, кат. № R92TC-1). Планшет считывали на MSD Sector Imager.

[0155] Результаты

[0156] Исследование с однократным введением дозы продемонстрировало, что антитела PI-3025 и PI-3048 имеют приемлемую ФК и хорошо переносятся. В форматах как анализа общего содержания, так и анализа свободной формы измеряли одинаковые концентрации лекарственного средства для каждого антитела.

[0157] Калибровочная кривая ФК для PI-3025-AB2 показана на **Фиг. 25А** и **таблице 12**.

Таблица 12						
	Формат LBA-анализа			Формат анализа общего содержания		
Номинальная конц., нг/мл	Обнаруженная средняя конц. (нг/мл)	Коэффициент вариации рассчитанной средней концентрации	Среднее значение восстановления, %	Обнаруженная средняя конц. (нг/мл)	Коэффициент вариации рассчитанной средней концентрации	Среднее значение восстановления, %
240	233	5	94	280	10	116
100	109	5	106	120	3	120
50	46	5	96	56	0	111
10	9	5	89	10	5	100
5	4	3	77	5	6	91

[0158] Калибровочная кривая ФК для PI-3048-AB показана на **Фиг. 25В** и **таблице 13**.

13.

Таблица 13						
	Формат LBA-анализа			Формат анализа общего содержания		
Номинальная конц., нг/мл	Обнаруженная средняя конц. (нг/мл)	Коэффициент вариации рассчитанной средней концентрации	Среднее значение восстановления, %	Обнаруженная средняя конц. (нг/мл)	Коэффициент вариации рассчитанной средней концентрации	Среднее значение восстановления, %
240	217	4,1	88	295	0	123
100	98	0,8	97	88	21	88
50	47	2,2	94	58	9	116

10	10	1,8	99	10	16	104
5	4	2,4	85	6	3	129

[0159] ФК анализы были успешно разработаны для измерения концентраций лекарственных средств в поисковом исследовании на ННР. Диапазон для ФК анализа составлял от 1,85 нг/мл до 300 нг/мл (в анализе) при минимальном требуемом разведении (MRD) 20. НПКО составлял 1,85 нг/мл, а ВПКО - 240 нг/мл. Контроль качества (КК) варьировался от 5 нг/мл до 240 нг/мл.

[0160] Результаты ФК анализа связывания лиганда *in vivo* показаны на **Фиг. 26А**. PI-3025-AB2 не показало определяемых уровней лекарственного средства после 21-го дня (504 ч) в анализе связывания лиганда (**Фиг. 26А**). PI-3048-AB обнаруживали вплоть до 28 дня (672 часа) в анализе связывания лиганда (**Фиг. 26А**). Результаты общего ФК анализа *in vivo* показаны на **Фиг. 26В**. PI-3025-AB2 обнаруживали до 21 дня (504 часа) и 28 дня (672 часа) (**Фиг. 26В**). PI-3048-AB обнаруживали вплоть до 28 дня (672 часа) (**Фиг. 26В**). Для животных, которым вводили PI-3048-AB, показана несколько лучшая экспозиция, чем для животных, которым вводили PI-3025-AB2.

[0161] Результаты ФК для PI-3025-AB2 и PI-3048-AB были сопоставимы как при анализе общего содержания, так и при анализе свободной формы. Антитела PI-3025-AB2 и PI-3048-AB имели приемлемую переносимость и хорошую экспозицию после исследования с однократным введением дозы.

Пример 8: Дополнительная характеристика антител к MARCO человека

[0162] Материалы и способы

[0163] Связывание клеток антителом к MARCO, кинетику связывания по SPR (K_D) и связывание макрофагов проводили, как описано ранее в **Примерах 2 и 5**.

[0164] Анализ блокирования связывания лиганда

[0165] Клетки 293Т, экспрессирующие MARCO человека, собирали вместе с исходными клетками 293Т. К клеткам добавляли краситель для оценки жизнеспособности клеток Zombie NIR (BioLegend), приготовленный путем 1000-кратного разбавления исходного раствора в D-PBS, и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре в темноте. Реакцию гасили добавлением 1 мл 4х буфера для окрашивания (2% FBS в DBPS, содержащем Ca^{2+}) с последующим центрифугированием при 400xg в течение 5 минут при 4°C. Затем клетки высевали в V-образные 96-луночные планшеты с плотностью 100000 клеток. Бактерии, флуоресцентно меченные A488, (*E.coli* от Invitrogen), добавляли в количестве 10 мкг/мл с представляющими интерес антителами к MARCO человека для 30-минутной инкубации при 37°C. Затем планшеты дважды промывали с последующим ресуспендированием в 100 мкл буфера для окрашивания на проточном цитометре (Attune NxT, Life Technologies). Данные проточной цитометрии анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (версия 10.6.1), и данные обрабатывали и дополнительно анализировали в программах Microsoft Excel и GraphPad Prism (версия 8).

[0166] Анализ связывания T-клеток

[0167] Был проведен стандартный анализ связывания на основе проточной цитометрии с использованием Т-клеток Jurkat, полученных от АТСС. 100000 клеток/лунка Т-клеток Jurkat высевали на 96-луночные планшеты с U-образным дном для окрашивания, и все стадии центрифугирования выполняли при 1500 об/мин при 4°C в течение 5 минут, а образцы хранили защищенными от света на протяжении всего протокола. Клетки осаждали и ресуспендировали в 100 мкл красителя для оценки жизнеспособности клеток Zombie NIR (BioLegend), приготовленного путем разбавления исходного раствора Zombie NIR диметилсульфоксидом (ДМСО) в 1000 раз в D-PBS. Клетки окрашивали путем инкубации в течение 10 мин при комнатной температуре (КТ) в темноте с последующим гашением реакции окрашивания добавлением обычной среды, содержащей 10% FBS. Клетки осаждали и ресуспендировали в 100 мкл различных антител к MARCO человека и соответствующих контролей изотипов hIgG1 и hIgG4 в свежеприготовленной среде для окрашивания (2% FBS в DBPS, содержащем Ca²⁺). Все мкАт тестировали при конечной максимальной концентрации 100 нМ (15 мкг/мл) с последующим трехкратным серийным разведением в 8 точках, включая контроль 0 мг/мл. Окрашивание проводили в течение 1 часа (ч) на льду с последующими 2 промывками в среде для окрашивания. Затем клетки осаждали и ресуспендировали в 100 мкл конъюгированного с аллофикоцианином (APC) козьего вторичного антитела к IgG мыши (Fc-специфического), подготовленного путем 500-кратного разведения исходного раствора антитела в среде для окрашивания, и инкубировали в течение 30 мин на льду. Затем планшеты дважды промывали средой для окрашивания с последующим ресуспендированием в 150 мкл того же буфера для сбора данных на проточном цитометре (Attune NxT, Life Technologies). Данные проточной цитометрии анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo (версия 10.6.1), и данные обрабатывали и дополнительно анализировали в программах Microsoft Excel и GraphPad Prism (версия 8). Полумаксимальные эффективные концентрации (EC50) рассчитывали на основе средних геометрических интенсивностей флуоресценции (гСИФ).

[0168] *Оценка термостабильности мкАт с использованием динамического светорассеяния (DLS)*

[0169] В динамическом светорассеянии используется броуновское движение частиц в растворе или суспензии для измерения их размера. Скорость флуктуации прямо соответствует скорости диффузии рассеивающих частиц. Более крупные частицы диффундируют медленнее, что приводит к медленным оптическим флуктуациям, в то время как более мелкие частицы диффундируют быстрее, что приводит к быстрым оптическим флуктуациям. Коэффициент диффузии частиц можно определить из автокорреляционного анализа необработанных оптических сигналов и подбора полученной автокорреляционной функции. Размер частиц затем определяется по коэффициенту диффузии с помощью уравнения Стокса-Эйнштейна.

[0170] Измерения DLS проводили с использованием планшет-ридера Dynapro III (Wyatt Technology). Исследуемые антитела разводили в 1x PBS (Gibco, кат. № 14190-144), фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,02 мкм для удаления твердых частиц и

крупных агрегатов до конечной концентрации 1-2 мг/мл. Двадцать пять микролитров раствора антител добавляли в лунки 384-луночного планшета (Aurora, кат. № АВА210100А), а затем добавляли 5 мкл кремниевого масла (Alfa Aesar, кат. № А12728). Планшет накрывали и центрифугировали при 1000 x g в течение 1 мин для обеспечения удаления пузырьков воздуха. Затем планшет загружали в прибор DLS и собирали данные с использованием следующих настроек вместе с настройками прибора по умолчанию.

[0171] Начальная температура была установлена на уровне 25°C, после чего осуществлялось плавное повышение температуры со скоростью 1°C/мин до 85°C с включенным автоматическим ослаблением интенсивности лазера. Для каждой лунки проводили непрерывные измерения для определения коэффициента диффузии и гидродинамического радиуса. Значение температуры начала агрегации (Tagg) было получено с использованием интегрированного программного обеспечения Dynamics7.1, которое анализировало изменения радиусов, соответствующие изменению температуры, и идентифицировало температуру, соответствующую увеличению гидродинамического радиуса, как Tagg.

[0172] *Оценка термостабильности мкАт с использованием дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF)*

[0173] DSF выполняли с помощью прибора для ПЦР в реальном времени QuantStudio5 (Life Technologies) с использованием набора красителей для определения изменения термостабильности белков Protein Thermal Shift™ (Life Technologies, кат № 4461146) в соответствии с протоколами производителя. Использовали 384-луночные планшеты MicroAmp (Thermo Fisher, кат. № АВ1384/W) с 20 мкл образца на лунку. Моноклональные антитела разводили до концентрации 1 мг/мл в буфере для соответствующего состава, и образцы готовили следующим образом: пять микролитров буфера Protein Thermal Shift™, 12,5 мкл антитела (1 мг/мл) или буфера (отрицательный контроль), и 2,5 мкл разведенного красителя Protein Thermal Shift™ (8x) соединяли вместе для получения общего объема 20,0 мкл для каждой реакции. Перед добавлением в реакционную смесь SYPRO Orange разбавляли в 125 раз от 1000× концентрированного исходного раствора до рабочего раствора красителя в предоставленном буфере для анализа термостабильности. Для предотвращения обесцвечивания непосредственно перед экспериментом в реакционную смесь добавляли рабочий раствор SYPRO Orange. Измерение каждого образца проводили в четырех повторностях. Термическую денатурацию проводили путем повышения температуры от 25 °C до 95 °C со скоростью 0,017 °C в секунду. Интенсивность флуоресценции (возбуждение при 490 нм и испускание с использованием ROX-фильтра при 600-630 нм) фиксировали с интервалами 0,07°C и анализировали с помощью программного обеспечения Protein Thermal Shift (Life Technologies) с использованием подхода первой производной кривой плавления для расчета T_m. В этом методе T_m представляет собой температуру, соответствующую максимальному значению первой производной кривой плавления согласно DSF.

[0174] *Активация иммунного пути в диссоциированных опухолевых клетках человека (DTC)*

[0175] Диссоциированные опухолевые клетки (DTC) от четырех пациентов с НМРЛ были приобретены в DLS и разморожены в соответствии с рекомендациями производителя. Клетки подсчитывали и высевали примерно по 2М клеток на 24 лунки в 3 лунки в среде Ex vivo с противогрибковым раствором с антибиотиком, но без сыворотки. В каждую лунку, содержащую 1 мл среды, добавляли 5 мкг/мл R&D, RDM5 и RDM9, PI-3030 и hIgG1 (Ultra-LEAF). Через четыре часа при 37С клетки собирали в канонические пробирки на 15 мл и центрифугировали при 400хg в течение 5 мин при 4°С. Каждый осадок ресуспендировали в 600 мкл буфера для лизирования RLT с В-меркаптоэтанолом (в разведении 1:100).

[0176] Тотальную РНК выделяли из вышеуказанных образцов DTC с использованием набора Qiagen RNeasy Mini и получавшего контроль человека и была подвергнута высокопроизводительному секвенированию РНК. Библиотеки были подготовлены с использованием набора TruSeq Stranded mRNA компании Illumina и секвенированы на Illumina Novaseq 6000. Впоследствии данные были сопоставлены с геномом человека (GRCh38.p12), а значения экспрессии для каждого гена были сведены в таблицу с использованием программы для выравнивания STAR. Полученные матрицы экспрессии использовали в качестве входных данных для анализа дифференциальной экспрессии с использованием DESeq2. Полученные изменения кратности при сравнении PI-3010 с контролем для всех генов, кодирующих белок, были загружены в программное обеспечение для анализа представленности групп генов (GSEA) с использованием предварительно рангового критерия, доступного от Института Брода по веб-адресу <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>. Были оценены пути ключевых фенотипических признаков MSigDB, и полученные нормализованные оценки представленности были нанесены на график с использованием ggplot2 в R. Значения FDR были определены с помощью пермутационного критерия, встроенного в GSEA, с использованием стандартных параметров.

[0177] *Провоспалительная сигнатура в супрессорных макрофагах человека (M2c)*

[0178] Четыре пробирки замороженных CD14+ моноцитов периферической крови человека, выделенных из мононуклеарных клеток периферической крови с помощью негативной иммуномагнитной селекции (StemCell Technologies), размораживали и культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% (об./об.) термоинактивированной FBS (HyClone), 1 mM пирувата натрия, заменимых аминокислот, 2 mM L-глутамина, 55 мкМ β-меркаптоэтанол и противогрибкового раствора с антибиотиком (все от Gibco). Моноциты дифференцировали в макрофаги путем культивирования в полной среде RPMI 1640 в присутствии 50 нг/мл колониестимулирующего фактора макрофагов человека (M-CSF) (PeproTech) при плотности 500000 клеток на лунку в 24-луночных планшетах. На 3-й день дифференцировки в среду добавляли свежий M-CSF. Дифференцированные макрофаги человека поляризовали путем добавления в среду следующих цитокинов на 24

часа при 37°C: M0 (без добавления цитокинов) и 25 нг/мл рекомбинантного человеческого IL-10 (состояние M2) на 24 часа при 37°C. На 7-й день среду аспирировали и клетки осторожно промывали. Свежую полную среду для культивирования макрофагов RPMI 1640 с 5 мкг/мл PI-3010.15, PI-3030.41 и hIgG1 (Ultra-LEAF от Biolegend) добавляли в каждую лунку из 2 вышеуказанных условий. Через 4 часа среду аспирировали и клетки лизировали в буфере RLT с β -меркаптоэтанолом (в разведении 1:100).

[0179] Тотальную РНК выделяли из поляризованных IL-10 hMDM с использованием набора Qiagen RNeasy Mini Kit и подвергали высокопроизводительному секвенированию РНК. Библиотеки были подготовлены с использованием набора TruSeq Stranded mRNA компании Illumina и секвенированы на Illumina Novaseq 6000. Впоследствии данные были сопоставлены с геномом человека (GRCh38.p12), а значения экспрессии каждого гена были сведены в таблицу для всех MDM с использованием программы для выравнивания STAR. Полученные матрицы экспрессии использовали в качестве входных данных для анализа дифференциальной экспрессии с использованием DESeq2. Полученные изменения кратности при сравнении PI-3010.15 с контролем для всех генов, кодирующих белок, были загружены в программное обеспечение для анализа представленности групп генов (GSEA) с использованием предварительно рангового критерия, доступного от Института Брода по веб-адресу www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp. Были оценены пути ключевых фенотипических признаков MSigDB, и полученные нормализованные оценки представленности были нанесены на график с использованием ggplot2 в R. Значения FDR были определены с помощью пермутационного критерия, встроенного в GSEA, с использованием стандартных параметров.

[0180] *Признаки ключевых фенотипических признаков: BMDM, обработанные PI-3008, по сравнению с опухолями CT26, обработанными PI-3008*

[0181] Отдельные бедра и голени четырех самок мышей BALB/c очищали и измельчали в среде для культивирования макрофагов, состоящей из модифицированной среды Дульбекко в модификации Искова с добавлением 10% (об./об.) эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone) и противогрибкового раствора с антибиотиком (Gibco), с помощью ступки и пестика. Затем образцы пропускали через фильтр с диаметром пор 40 мкм, промывали средой и осаждали при 400×g в течение 5 мин при комнатной температуре. Клеточные осадки ресуспендировали в 5 мл буфера BD Pharm Lyse (BD Biosciences) и проводили лизис эритроцитов при комнатной температуре в течение 5 минут с последующим гашением 10 объемами среды для культивирования макрофагов. Клетки осаждали при 400×g в течение 5 мин при комнатной температуре и ресуспендировали в среде для культивирования макрофагов с плотностью 500000 клеток на лунку в 24-луночных планшетах. Эти мононуклеарные клетки костного мозга стимулировали 25 нг/мл мышинового макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) (PeproTech) в течение 6 дней для получения макрофагов M0 и поляризовали в

M1-подобные и M2-подобные макрофаги путем добавления среды с ЛПС (1 нг/мл) и мышинным IL-10 при 20 нг/мл, соответственно, в течение 24 часов при 37C.

[0182] На 7-й день среду аспирировали и клетки осторожно промывали средой для культивирования макрофагов. В каждую лунку добавляли свежую среду с 5 мкг/мл PI-3008 или его изотипического контроля mIgG2a из трех условий: M0, M1 и M2. Через 4 часа среду аспирировали и клетки лизировали в буфере RLT с β-меркаптоэтанолом (в разведении 1:100).

[0183] Тотальную РНК выделяли из этих BMDM с использованием набора Qiagen RNeasy Mini и опухолей CT26 (ранее описанных для фигур 12C-12H) и подвергали высокопроизводительному секвенированию РНК. Библиотеки были подготовлены с использованием набора TruSeq Stranded mRNA компании Illumina и секвенированы на Illumina Novaseq 6000. Впоследствии данные были сопоставлены с геномом мыши (GRCm38.p6), и значения экспрессии каждого гена были сведены в таблицу для всех образцов BMDM и образцов CT26, соответственно, с использованием программы для выравнивания STAR. Полученные матрицы экспрессии использовали в качестве входных данных для анализа дифференциальной экспрессии с использованием DESeq2. Полученные изменения кратности при сравнении PI3008 с (из субпопуляций BMDM и CT26) контролем для всех генов, кодирующих белок, были загружены в программное обеспечение для анализа представленности групп генов (GSEA) с использованием предварительно рангового критерия, доступного от Института Брода по веб-адресу: gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp. Пути ключевых фенотипических признаков MSigDB были оценены для сравнения BMDM и CT26, а полученные нормализованные оценки представленности были нанесены на график с использованием ggplot2 в R.

[0184] *Анализ цитокинов методом кПЦР*

[0185] Две пробирки замороженных CD14+ моноцитов периферической крови человека, выделенных из мононуклеарных клеток периферической крови с помощью негативной иммуномагнитной селекции (StemCell Technologies), размораживали и культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% (об./об.) термоинактивированной FBS (HyClone), 1 mM пирувата натрия, заменимых аминокислот, 2 mM L-глутамина, 55 мкМ β-меркаптоэтанол и противогрибкового раствора с антибиотиком (все от Gibco). Моноциты дифференцировали в макрофаги путем культивирования в полной среде RPMI 1640 в присутствии 50 нг/мл колониестимулирующего фактора макрофагов человека (M-CSF) (PeproTech) при плотности 500000 клеток на лунку в 24-луночных планшетах. На 3-й день дифференцировки в среду добавляли свежий M-CSF. Дифференцированные макрофаги человека поляризовали на 6-й день добавлением 25 нг/мл рекомбинантного человеческого IL-10 (состояние M2) на 24 часа при 37C. На 7-й день среду аспирировали и клетки осторожно промывали. Свежую полную среду для культивирования макрофагов RPMI 1640 с 5 мкг/мл PI-3010.15 (PI-3015), PI-3010.25 (PI-3025), PI-3030.41 (PI-3041) или изотипический контроль hIgG1 (Ultra-LEAF от Biolegend) и 5 мкг/мл PI-3010.46 (PI-3046), PI-3030.47 (PI-3047), PI-3010.48 (PI-3048) или изотипического контроля hIgG4 (Ultra-

LEAF от Biolegend) добавляли в соответствующие лунки. Через 4 часа среду собирали в 96-луночные планшеты для секретиции цитокинов Luminex и клетки лизировали в буфере RLT с β -меркаптоэтанолом (в разведении 1:100). Тотальную РНК выделяли из поляризованных IL-10 hMDM с использованием набора Qiagen RNeasy Mini, а 250 нг РНК превращали в одноцепочечную ДНК с использованием набора High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). кПЦР проводили с использованием 5 мкл смеси SYBR green и праймеров, специфичных к IL-6, IL-1b, IL10, TNFa, CXCL10, IL18, CCL20, CCL24, IL1A. Тестируемые праймеры для эндогенных конститутивных генов представляли собой GAPDH и RPL37A. Планшеты анализировали на приборе QuantStudio 5 qPCR от Thermo Fisher.

[0186] Этот анализ экспрессии цитокинов на основе кПЦР повторяли для нескольких доноров hMDM и в различных циклах с титрованием концентрации перспективных антител hIgG1 до 1 мкг/мл по сравнению с изотипом hIgG1 (PI-0003). Кроме того, этот анализ использовали для подтверждения активации сигнатуры провоспалительных генов. Во всех анализах оценивали экспрессию IL-6, TNFa, IL-1b, IL10, IL18, CCL20, CCL24, CXCL8, IL1A на предмет провоспалительной активации.

[0187] Кроме того, этот анализ использовали для подтверждения активации сигнатуры провоспалительных генов ниже PI-3010.15-AB в моноцитарных клетках THP-1, сверхэкспрессирующих полноразмерный MARCO человека.

[0188] Анализ методом кПЦР выполняли путем вычисления кратности изменения для обработанных образцов по сравнению с соответствующим изотипическим контролем с использованием $2^{-(\Delta\Delta CT)}$. Значение CT каждого гена нормализовали к значению CT используемого эндогенного контроля (такого как GAPDH или RPL37A).

[0189] Секретиция цитокинов и хемокинов человека согласно MSD

[0190] 200 мкл супернатанта, собранного из клеток hMDM, обработанных человеческим антителом к MARCO PI-3010.15, PI-3010.25 и PI-3030.41 и изотипом, оценивали на уровне цитокинов с использованием набора V-PLEX Proinflammatory Panel 1 Human Kit, которая позволяет измерить уровень 10 цитокинов (MSD, кат. № K15049D), и набор V-PLEX Chemokine Panel 1 Human Kit, которая позволяет измерить уровень 10 хемокинов (MSD, кат. № K15049D) от Meso Scale Discovery (MSD, кат. № K15047D), или индивидуальный набор 26-Plex Human ProcartaPlex от Thermo Fisher (кат. № PPX-26-MX-3222A). Планшеты для мультиплексного анализа MSD предварительно покрывали захватывающими антителами. Образцы для анализа или стандарты набора добавляли в объеме 50 мкл на лунку после предварительного разбавления исходного образца разбавителем для анализа. Планшеты промывали после двухчасовой инкубации при комнатной температуре при перемешивании.

[0191] Для анализа V-PLEX добавляли сульфо-меченные детектирующие антитела и инкубировали еще два часа при комнатной температуре при перемешивании. После инкубации планшеты еще раз промывали. Добавляли 2X Read Substrate, и планшеты

считывали с помощью ридера MSD. Все данные проанализировали с помощью программного обеспечения MSD Discovery Workbench® 4.0.

[0192] Для индивидуального набора Human 26-Plex Kit добавляли биотинилированные меченые детектирующие антитела и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре при перемешивании. Планшеты промывали. Добавляли стрептавидин, меченый PE (фикоэритрином), и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре при перемешивании. После промывки планшетов добавляли буфер для считывания Luminex и планшеты считывали на анализаторе Luminex 200. Все данные анализировали с помощью программного обеспечения xPONENT.

[0193] Результаты

[0194] Последовательности ДНК тяжелой и легкой цепей антител PI-3010.15, PI-3010.25 и PI-3030.41 кодон-оптимизировали и включали в запатентованные векторы Atum (Ньюарк, штат Калифорния). Векторы, кодирующие тяжелую и легкую цепи, трансфицировали в клетки CHO в масштабе 2 л с последующей очисткой с использованием смолы MabSelect Sure Protein A. Оба кандидата показали высокие титры и <5% агрегатов после очистки белком А. Данные обобщены в **таблице 14**.

Таблица 14					
Антитело	Зародышевая линия	Изотип	Экспрессия CHO-транзигентная (мг/л)	Теоретическая рI	% мономера (после белка А)
PI-3010.15-N1	IGHV1-46 IGKV1-39	hIgG1	585	8,45	>95
PI-3010.25-N1	IGHV1-46 IGKV1-39	hIgG1	818	8,11	>95
PI-3030.41-N1	IGHV1-59 IGKV1-39	hIgG1	868	8,44	>95

[0195] Связывание PI-3010.15, PI-3010.25 и PI-3030.41 оценивали с помощью Вiasore на рекомбинантном белке MARCO человека и яванского макака и продемонстрировали высокую аффинность связывания с белком как человека, так и яванского макака, при этом аффинность связывания с MARCO яванского макака была в 2-3 раза выше аффинности с MARCO человека.

[0196] Проточную цитометрию использовали для оценки связывания антител с линиями клеток, которые экспрессируют MARCO человека и яванского макака, включая трансфицированные MARCO клетки HEK 293Т и человеческие моноцитарные макрофаги (MDM), экспрессирующие эндогенный MARCO. Антитела связывались с MARCO человека и яванского макака с сопоставимыми значениями EC50 и связывались с эндогенным MARCO на MDM человека с высокой аффинностью. Не наблюдали нецелевого связывания с исходными клетками HEK 293Т, которые не экспрессировали

	анализа	3010.25 (PI-3025) (hIg1)	3010.48 (PI-3048) (hIg4)	3010.15 (PI-3015) (hIg1)	3010.46 (PI-3046) (hIg4)	3030.41 (PI-3041) (hIg1)	3030.47 (PI-3047) (hIg4)
Аффинность связывания с MARCO человека (KD)	Biacore (SPR, нМ)	1,09	1,05	0,51	0,78	0,82	0,72
Исследование термостабильности (PBS)	Tm1 (DSF, °C)	68	65	68	64	68	64
Исследование термостабильности (PBS)	Tagg (DLS, °C)	83	73	78	72	78	71
Растворимость (30 мг/мл)	ЭХ, DLS	Растворим и стабилен до 30 мг/мл в цитратных и ацетатных буферах, pH 5,0-6,0					

[0198] Также оценивали экспрессию цитокинов, индуцированную человеческими антителами к MARCO в hMDM. Как показано в **таблице 17**, все PI-3010.15, PI-3010.46, PI-3010.25, PI-3010.48, PI-3030.41 и PI-3030.47 индуцировали экспрессию указанных генов цитокинов у донора 1. Экспрессия цитокина и других соответствующих генов (MIP-1 α , IL-27, LIF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IP-10, IL-6, IL-10, CD40, IL-12p70, G-CSF, IFN γ , GM-CSF, TNF α , MIP-1 β , MCP-1, MIG, GRO-альфа, IL-1 α , IL-15, MCP-3, M-CSF, и VEGF-A) в hMDM от двух разных доноров (донор 1 и донор 2) также показана на **Фиг. 27**.

Таблица 17. Кратность индукции гена относительно изотипа						
Донор 1	IL-6	TNFα	CXCL10	IL18	CCL20	IL1A
IgG1 PI-3010.15	1,3	2,2	1,5	1,8	1,4	2,4
IgG4 PI-3010.46	1,8	1,9	1	1,8	1,7	3,6
IgG1 PI-3010.25	1,2	2,5	1,5	3,9	1,5	4,1
IgG4 PI-3010.48	1	2,1	0,9	1,5	1,3	3,6
IgG1 PI-3030.41	1,3	3,2	1,9	4,3	1,6	7,8
IgG4 PI-3030.47	2	3,2	1,8	1,3	1,8	6,6

[0199] На **Фиг. 28** представлены данные кПЦР по мРНК (TNF α , IL-1 β , IL-18 и CXCL8) и данные MSD по цитокинам (TNF α , IL-1 β , IL-6, MIP1- α) для PI-3010.15, PI-3010.25 и PI-3030.41, а также контроля hIgG1. Результаты анализа мРНК провоспалительных генов с помощью кПЦР были представлены в виде кратности индукции по сравнению с изотипическим контролем hIgG1 одного репрезентативного

донора (верхний ряд). Данные представлены в виде средних значений для технических повторностей \pm стандартное отклонение (станд. откл.). Секрецию цитокинов также измеряли с помощью MSD и отображали данные для уровней (пг/мл) репрезентативных уровней провоспалительных цитокинов и хемокинов (нижний ряд). Данные представлены как средние значения технических повторностей одного и того же репрезентативного донора \pm стандартное отклонение (станд. откл.).

[0200] Диссоциированные опухолевые клетки человека, обработанные PI-3010.15 hIgG1 в качестве контроля, и обработанные PI3008/контролем опухоли CT26, обрабатывали, как описано выше (**Фиг. 16B**). Полученные из GSEA нормализованные оценки представленности из обоих экспериментов были нанесены на график с использованием ggplot2 в R. Как показано на **Фиг. 29**, мкАТ к MARCO человека и мыши обеспечивают сходную регуляцию путей.

[0201] PI-3010.15 активировало противоопухолевые иммунные пути в диссоциированных опухолевых клетках человека (DTC) (**Фиг. 30**). Основные гены и пути иммунной активации усиливались антителом к MARCO в hDTC, включая сигналинг IL-2-STAT5, сигналинг TNF α через NF- κ B, сигналинг IL-6-JAK-STAT3, воспалительный ответ, ответ IFN γ и ответ IFN α (**Фиг. 30**). Эти пути также активировались PI-3008 в опухолевых клетках мыши и BMDM, как показано в **Примере 4**. Пути, ослабляемые антителом к MARCO, в hDTC, включали гипоксию, апикальные соединения, мишени Мус, мишени PI3K-AKT-mTOR, E2F и окислительное фосфорилирование. Эти пути также подавлялись PI-3008 в опухолевых клетках мыши и BMDM, как показано в **Примере 4**. Пути были определены с использованием набора путей ключевых фенотипических признаков.

[0202] PI-3010.15 также индуцировало провоспалительную сигнатуру в супрессорных макрофагах человека (M2c) (**Фиг. 31**). Цитокины и гены, экспрессия которых была повышена, представляли собой CXCL3, CXCL8, TNF α , CCL3, IL7R, CCL4, CCL5, CCL24, CCL20, IL-1 α , IL-6, IDO, CD274, SF2, LAMP3, CCR7, CXCL11 и CXCL9. Цитокины и гены, экспрессия которых была снижена, представляли собой ALK, MPB, TMEM37, NHSL2, SLC46A2. Активированные пути включали сигналинг TNF α через NF- κ B, воспалительный ответ, ответ INF γ , мишени Мус, гипоксию, сигналинг IL6/JAK/STAT3, ответ IFN α , реакцию развернутых белков, сигналинг IL2/STAT5, ответ на УФ-излучение, отторжение аллотрансплантата, эпителиально-мезенхимальный переход, апоптоз, сигналинг mTORC1, ранний ответ на эстроген, активацию сигналинга KRAS, гомеостаз холестерина, сигналинг Notch, апикальное соединение, сигналинг wnt бета-катенина, окислительное фосфорилирование, комплемент, сигналинг PI3k Akt mTOR, путь активных форм кислорода, сигналинг Hedgehog, ангиогенез, гликолиз, подавление сигналинга KRAS, репарацию ДНК, путь p53, миогенез, коагуляцию, апикальную поверхность, ответ на андрогены, сигналинг TGF β , метаболизм жирных кислот и метаболизм ксенобиотиков.

[0203] Подавленные пути включали метаболизм желчных кислот, поздний ответ на эстроген, адипогенез, пероксисомы, метаболизм гема, подавление ответа на УФ-

излучение, митотическое веретено, секрецию белка, сперматогенез, контрольную точку G2M и мишени E2F. Ключевые провоспалительные гены и пути, индуцируемые PI-3010.15 в hMDM M2c, включали сигналинг IL-2-STAT5, сигналинг TNF α через NF-kB, сигналинг IL-6-JAK-STAT3, воспалительный ответ, ответ IFN γ и ответ IFN α . Пути были определены с использованием набора путей ключевых фенотипических признаков. Сходные пути индуцировались в BMDM, обработанных PI-3008.

[0204] Сравнение кратности изменения экспрессии цитокинов, индуцированного PI-3010.15 и PI3030.41, показано на **Фиг. 32**. PI-3010.15 индуцировало более высокие уровни IL-1 β , CSF3, CSF2, IL-1 α , IL-6, TNF α , CCL4, CXCL1, CCL3 и CXCL10 по сравнению с PI-3030.41.

[0205] В **таблицах 18** и **19** представлена сравнительная сводка выбора антител к MARCO и их характеристик. (-) указывает на отсутствие различий между антителами, (+) указывает на преимущество.

Таблица 18			
Критерии/тест	PI-3010.15	P-3010.25	P-3030.41
К _D для человека (авидность)	-	-	-
К _D для яванского макака (авидность)	-	-	-
Связывание по ИФА	-	-	-
Расчетная (In silico) уязвимость последовательности	Окисление (низкое) Деамидирование (низкое) +	Деамидирование (низкое) Изомеризация (высокая)	Деамидирование (низкое) Изомеризация (высокая)
Наблюдаемые подверженности (форсированная деградация)	Окисление (низкое) +	Изомеризация (низкая)	Деамидирование (высокое) Изомеризация (высокая)
Агрегация (ЭХ, DLS, НИС из транзистентной экспрессии)	+	+	
Агрегация (ЭХ из стабильных объединенных трансфицированных материалов Lonza)	+	+	
Тепловой стресс (DLS, DSF)	-	-	-
Стабильность с течением	+		

времени (DLS, ЭХ, SPR)			
Риск деамидирования и изомеризации	+		
Функциональные анализы in vitro	+		
Таблица 19			
Анализы in vitro	PI-3010.15	PI-3010.25	PI-3030.41
Связывание с клетками со сверхэкспрессией и отсутствие связывания с отрицательными по антигену клетками	-	-	-
Конкуренция за связывание лигандов с доменом SRCR	-	-	-
Экспрессия на поверхности в клетках hMDM и THP1, поляризованных IL-10	+		
Секвенирование РНК в DTC	+	+	
Секвенирование РНК в hMDM	+	Не тестировали	
кПЦР для оценки экспрессии генов в hMDM	-	-	-
Анализ секреции цитокинов с помощью MSD и/или Luminex	-	-	-
Увеличение количества инфламмасом в hMDM	+		
Анализ репортера NF-κB в клетках THP1-Blue™ NF-κB	+	+	
Легкое усиление фагоцитоза	+	+	

[0206] Для определения наличия каких-либо потенциальных уязвимостей в последовательностях трех выбранных антител был использован алгоритм Sentinel APART (Lonza) для анализа последовательностей кандидатов in silico. Проблемные моменты, которые были отмечены анализом in silico, представляли собой: повышенную гидрофобность, склонность к агрегации, изомеризацию аспартата и уязвимость к окислению. Предыдущая оценка in silico показала аналогичные уязвимости, которые были отмечены, но оказались незначительными при тестировании в различных стрессовых

условиях и анализах форсированной деградации. В **таблице 20** ниже показана сводка экспериментальных данных в сравнении с теоретическими данными.

Таблица 20								
Антитело	Агрегация		Деамидирование		Изомеризация/Фрагментация		Окисление	
	Рассчитанный (in silico)	Наблюдаемый (НЭС)	Рассчитанный (in silico)	Наблюдаемый (НЭС)	Рассчитанный (in silico)	Наблюдаемый (НЭС)	Рассчитанный (in silico)	Наблюдаемый (НЭС)
PI-3010.15	Высокая	Низкая	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (2)	0 (2)
PI-3010.25	Высокая	Низкая	0 (1)	0 (0)	1 (0)	0 (1)	0 (1)	0 (0)
PI-3030.41	Высокая	Низкая	0 (2)	1 (1)	2 (0)	1 (1)	0 (3)	0 (0)

[0207] Общую гидрофобность перспективных кандидатов оценивали с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий (НЭС). Более длительное время удерживания указывает на большую гидрофобность. В этом анализе в качестве положительного контроля использовали антитело к TREM1. Все антитела PI-3010.15, PI-3010.25 и PI-3030.41 показали гидрофобность в диапазоне, ожидаемом для антител (**таблица 21**). Высокие уровни % основного пика указывают на меньшее количество модификаций, а более низкое время удерживания соответствует более низкой гидрофобности.

Таблица 21		
Номер образца	Главный пик (%)	Время удержания (мин)
PI-3010.15	88,7	15,7
PI-3010.25	95,8	15,6
PI-3030.41	70,7	11,5

[0208] Было проведено исследование форсированной деградации, чтобы понять уязвимости выбранных антител. Образцы PI-3010.15-N1, PI-3010.25-N1 и PI-3030.41-N1 инкубировали в условиях стресса (окисление, низкий pH и высокий pH) и анализировали с помощью пептидного картирования (ЖХ-МС/МС) для выявления белковых модификаций в мкАт. Основное внимание уделялось анализу уязвимостей в отношении изомеризации и окисления. Кроме того, для оценки стабильности каждого антитела в различных стрессовых условиях использовали другие параметры (**таблица 22**).

Таблица 22						
Образец	Источник	Изотип	конц.	Условие	Время	Показатель

			(мг/мл)			
PI-3010.25	CHO-ATUM	hIgG1	8,4	4°C (контроль PBS)	2 недели	Nanodrop (A280) ЭХ (агрегация) DLS (Tagg, размер)
PI-3010.41	CHO-ATUM	hIgG1	9,5	40°C (PBS) 40°C (pH 5,5) 40°C (pH 8,5)		DSF (стабильность домена)
PI-3010.15	CHO-ATUM	hIgG1	10,5	40°C (PBS) + ААРН (6ч) 25°C (pH 3,5)		ЖХ-МС (картирование пептидов для обнаружения модификаций) Анализ зарядовых вариантов Biacore (связывание)

[0209] Изомеризация

[0210] PI-3010.15 инкубировали при следующих условиях: 40°C в PBS в течение 2 недель, контроль в PBS при -80°C, 40°C (PBS) + 1 мМ ААРН в течение 6 ч и 40°C в ацетате натрия с pH 5,5 в течение 2 недель. После обработки образцы анализировали с помощью ЖХ-МС/МС, которая определяла % модификации выделенных пептидов, полученных из антитела после расщепления трипсином.

[0211] Пептидное картирование ЖХ/МС было выполнено на PI-3010.15 после инкубации при низком pH в течение продолжительного времени для выявления потенциальных горячих точек. PI-3010.15 не продемонстрировало образования изоаспартата (IsoAsp), деамидирования или сукцинимидов. PI-3010.25 продемонстрировало образование IsoAsp в остатке D56 легкой цепи (>2%, только при pH 5,5, 40°C) и D72 тяжелой цепи (3,7% при pH 3,5), в то время как PI-3030.41 продемонстрировало IsoAsp в D56 легкой цепи (>2,7%, при pH 5,5, 40°C) и сукцинимид по остатку N52 тяжелой цепи (6-9% во всех условиях, включая контроль).

[0212] Окисление:

[0213] PI-3010.15 инкубировали в следующих условиях: контроль в PBS при -80°C, 40°C (PBS) + 1 мМ ААРН в течение 6 ч, 0,5 и 1,5% H₂O₂ в PBS в течение 24 ч, что сравнивалось с предыдущим экспериментом при 40°C (PBS) + 1 мМ ААРН в течение 6 часов. После обработки образцы анализировали с помощью ЖХ-МС/МС, которая

определяла % модификации выделенных пептидов, полученных из антитела после расщепления трипсином.

[0214] PI-3010.15 показало окисление Met-48 и Trp-52 при обработке AAPH и H₂O₂. Trp-52 был выделен как потенциальной уязвимый при оценке *in silico*. Предполагается, что остаток Met-48 находится в структуре и недоступен для растворителей. Невозможно однозначно приписать уязвимость к окислению ни одному из остатков, поскольку они обнаруживаются как часть одного и того же пептида во время анализа ЖХ-МС/МС.

[0215] Связывание подвергнутых стрессу образцов с рекомбинантным MARCO человека оценивали с помощью Biacore. Связывание подвергнутых стрессу образцов имело сходные уровни K_D и R_{max} по сравнению с контрольными условиями, что позволяет предположить, что эффективность связывания не была существенно затронута (таблица 23), включая различные окисленные подвергнутые стрессу образцы из PI-3010.15 (таблица 24).

Таблица 23										
Связывание с MARCO										
Антите- ло	Контроль		40°C, 2 недель		Деамидиров- ание (40°C, 2 недели)		Изомеризац- ия/ Фрагментац- ия		Окисление (1мМ ААРН, 6ч)	
	K_D (нМ)	R_{max} x	K_D (нМ)	R_{max} x	K_D (нМ)	R_{max} x	K_D (нМ)	R_{max} x	K_D (нМ)	R_{max} x
PI- 3010.15	1,2	131,7	1,2	103,8	1,24	111,3	1,24	108,6	1,29	104,5
PI- 3010.25	0,54	63,2	0,58	62,2	0,66	62,4	0,66	62,4		
PI- 3030.41	0,24	62	0,36	54,3	0,39	54,8	0,34	48,9		

Таблица 24									
Окисление									
Антите- ло	Контроль		0,5% H₂O₂ (24 ч, КТ)		1,5% H₂O₂ (24 ч, КТ)		1мМ ААРН, 6ч 40°C)		
	K_D(нМ)	R_{max}	K_D (нМ)	R_{max}	K_D (нМ)	R_{max}	K_D (нМ)	R_{max}	R_{max}
PI- 3010.15	0,97	111,7	1,05	97,1	1,07	109,5	1,10	97,6	

[0216] 3 антитела (PI-3010.15, PI-3010.25 и PI-3030.41) успешно концентрировали до 30 мг/мл в следующих буферах в диапазоне pH 5,0-6,0 без каких-либо других эксципиентов. PBS использовали в качестве контроля. Антитела инкубировали при 4°C в течение ночи перед следующими анализами: % агрегации с помощью ЭХ-ВЭЖХ; размер (радиус) и полидисперсность с использованием DLS; термическую стабильность [Tagg (DLS), Tm (DSF)]; коллоидную стабильность (kd) с помощью SLS.

[0217] PI-3010.25 концентрировали в следующих буферах (таблица 25).

Буфер	pH	Концентрация мкАт (мг/мл) для PI-3010.25
10 mM гистидин-HCl	6,0	27,1
10 mM гистидин-HCl	5,5	36,4
10 mM натрий цитрата	6,0	33,2
10 mM натрий цитрата	5,5	35,8
10 mM натрий цитрата	5,0	29,7
10 mM натрий ацетата	5,5	33,4
10 mM натрий ацетата	5,0	36,1
PBS (контроль)	7,4	30,4

[0218] PI-3010.25 можно было концентрировать до 30 мг/мл без увеличения агрегатов с высокой молекулярной массой.

Пример 9: Антитело к MARCO индуцирует активацию инфламмасом

[0219] Материалы и способы

[0220] Анализ инфламмасом в tBMDM

[0221] Бедрa и голени трех самок мышей C57BL/6 и трех самок BALB/c очищали и измельчали в среде для окрашивания (0,5% (вес/объем) BSA (Sigma) и 2 mM ЭДТА в D-PBS) с использованием ступки и пестика. Затем образцы пропускали через фильтр с диаметром пор 40 мкм, промывали D-PBS и осаждали при 400×g в течение 5 мин при комнатной температуре. Клеточные осадки ресуспендировали в 5 мл буфера BD Pharm Lyse (BD Biosciences) и проводили лизис эритроцитов при комнатной температуре в течение 5 минут с последующим гашением 10 объемами среды для окрашивания. Клетки осаждали при 400xg в течение 5 минут при комнатной температуре и ресуспендировали в среде для культивирования макрофагов, состоящей из среды Дульбекко в модификации Искова с добавлением 10% (об./об.) фетальной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone) и противогрибкового раствора с антибиотиком (Gibco), при плотности 15×10^6 клеток/мл в чашках диаметром 15 см. Эти мононуклеарные клетки костного мозга стимулировали 25 нг/мл мышиногo макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) (PeproTech) в течение 7 дней для получения макрофагов M0 и дифференцировали в M2-подобные путем добавления в среду мышиногo IL-1b в концентрации 20 нг/мл на 6-й день в течение

24 часов при 37°C. На 7-й день макрофаги промывали DPBS и инкубировали в 6 мл 2 мМ ЭДТА в течение 10 минут для ускорения открепления клеток. Клетки осторожно соскабливали в дополнительные 6 мл среды для окрашивания, описанной выше, подсчитывали и высевали на 96-луночные планшеты по 100000 клеток на лунку.

[0222] После выдерживания от 30 минут до 1 часа при 37°C, чтобы дать возможность клеткам прикрепиться, hMDM обрабатывали 5 мкг/мл антитела к MARCO мыши PI-3008 и его соответствующего изотипического контрольного mIgG2a. После 3 часов инкубации с антителами добавляли липополисахарид (тестировали при 0,5 и 50 нг/мл) для стимуляции воспалительного пути еще на 2,5 часа. Затем добавляли АТФ (5 мМ) на 30 минут, чтобы активировать инфламмосомы и индуцировать секрецию цитокинов IL-1 β , которую измеряли с помощью MSD. Критерий множественных сравнений Сидака использовали для расчета статистической значимости кратности изменения секретлируемого IL-1 β по сравнению с необработанной изотипом (без ЛПС и без АТФ). Критерий множественных сравнений Сидака, **P<0,01.

[0223] *Анализ инфламмосом в hMDM*

[0224] Замороженные CD14⁺ моноциты периферической крови человека, выделенные из мононуклеарных клеток периферической крови с помощью негативной иммуномагнитной селекции (StemCell Technologies), размораживали и культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% (об./об.) термоинактивированной FBS (HyClone), 1 мМ пирувата натрия, заменимых аминокислот, 2 мМ L-глутамин, 55 мкМ 2-меркаптоэтанола и противогрибкового антибиотика (все от Gibco). Моноциты дифференцировали в макрофаги путем культивирования в полной среде RPMI 1640 в присутствии 50 нг/мл колониестимулирующего фактора макрофагов человека (M-CSF) (PeproTech) при плотности 12-15 \times 10⁶ клеток в чашке диаметром 15 см. На 3-й день дифференцировки в среду добавляли свежий M-CSF. Дифференцированные макрофаги человека поляризовали путем добавления в среду следующих цитокинов на 24 часа при 37°C: 100 нг/мл IFN γ (состояние M1) и 25 нг/мл рекомбинантного человеческого IL-10 (состояние M2) на 24 часа при 37°C. На 7-й день поляризованные макрофаги осторожно собирали неферментативным путем с помощью стерильного клеточного скребка (Nunc) в буфер для FACS (D-PBS, содержащий 2 мМ ЭДТА и 0,5% (мас./об.) бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Sigma)) с последующим центрифугированием при 400xg в течение 5 мин при ~20°C.

[0225] Клетки подсчитывали и высевали на 96-луночные планшеты по 100000 клеток на лунку. После выдерживания от 30 минут до 1 часа при 37°C для прикрепления клеток hMDM обрабатывали 5 мкг/мл антител к MARCO человека PI-3010.15, PI-3010.25 (PI-3025), PI-3030.41 (PI-3041), и PI-3010.48 (PI-3048) и их соответствующими изотипическими контролями hIgG1 и hIgG4 (Ultra-leaf от Biolegend). После 3 часов инкубации с антителами добавляли липополисахарид (тестировали при 0,1 и 1 мкг/мл) для стимуляции воспалительного пути еще на 2,5 часа. Затем добавляли АТФ (5 мМ) на 30 минут, чтобы активировать инфламмосомы и индуцировать секрецию цитокинов IL-1 β ,

которую измеряли с помощью MSD. Критерий множественных сравнений Тьюки использовали для расчета статистической значимости кратности изменения секретлируемого IL-1 β по сравнению с необработанной (без ЛПС и без АТФ) hIgG1. Критерий множественных сравнений Тьюки (*P<0,05; ***P<0,0006, ****P<0,0001).

[0226] *Анализ фагоцитоза E.coli*

[0227] Человеческие моноцитарные макрофаги (MDM) получали путем культивирования CD14+ моноцитов человека в среде RPMI 1640 (Gibco) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco), 1% β -меркаптоэтанола (ThermoFisher), 1X заменимых аминокислот (Gibco), 1x пирувата натрия (Gibco), 1X GlutaMax (Gibco), 1x противогрибкового раствора с антибиотиком (Gibco), 50 нг/мл M-CSF (Peprotech) в чашке диаметром 15 см. Среду обновляли через 3 дня. На 6-й день культивирования к культуре добавляли 100 нг/мл человеческого IFN-g (Peprotech) + 50 нг/мл ЛПС (Invivogen) или 25 нг/мл IL-10 (Peprotech). На следующий день клетки собирали и высевали по 200000 клеток на лунку 96-луночного плоскодонного планшета и инкубировали с титрованием дозы PI-3101.15, PI-3010.25 или PI-3030.41 и изотипического контрольного антитела в течение 2 часов при 37°C и 5% CO₂ для обеспечения адгезии клеток.

[0228] Для измерения фагоцитоза использовали набор для анализа фагоцитоза Vibrant (Molecular Probes). После 2-часовой инкубации с антителами среду удаляли и клетки инкубировали с раствором флуоресцентно меченных E. coli BioParticles в течение 2 часов при 37°C и 5% CO₂. Раствор частиц удаляли и заменяли раствором трипанового синего. После 1 мин инкубации при комнатной температуре раствор удаляли и измеряли флуоресценцию с использованием длин волн возбуждения 480 нм и эмиссии 520 нм на микропланшетном ридере Tecan.

[0229] **Результаты**

[0230] PI-3008 индуцировало статистически значимую секрецию IL-1 β инфламмасомой как в неполяризованных макрофагах (**Фиг. 33А** и **33С**), так и в поляризованных IL-10 макрофагах (**Фиг. 33В** и **33D**). Этот эффект наблюдали у двух отдельных линий мышей, мышей C57BL/6 (**Фиг. 33А** и **33В**) и мышей Balb/c (**Фиг. 33С** и **33D**). Таким образом, PI-3008 усиливает и увеличивает активацию инфламмасом в BMDM мышей.

[0231] Сходные результаты наблюдались для MDM человека (**Фиг. 34А, 34В, и 35**). Как PI-3010.25 (формат IgG1), так и PI-3010.48 (формат IgG4) индуцировали статистически значимую секрецию IL-1 β в поляризованных IL-10 макрофагах после инкубации с 0,1 мкг/мл ЛПС+АТФ и 1 мкг/мл ЛПС+АТФ (**Фиг. 34А**). В поляризованных IFN- γ hMDM PI-3025 индуцировало секрецию IL-1 β после инкубации с 0,1 мкг/мл ЛПС+АТФ, тогда как PI-3010.48 индуцировало секрецию IL-1 β после обработки 1 мкг/мл ЛПС+АТФ (**Фиг. 34В**). Столбцы для PI-3010.25 показаны вторыми слева в каждой группе, столбцы для PI-3010.48 показаны справа в каждой группе.

[0232] В отдельном анализе все PI-3010.15, PI-3010.25 и PI-3030.41 индуцировали выработку IL-1 β при обработке ЛПС и АТФ по сравнению с условием без обработки

(Фиг. 35), что указывает на то, что антитела к MARCO человека индуцируют активацию инфламмасом.

[0233] Процентное значение индукции фагоцитоза PI-3010.15, PI-3101.25 и PI-3030.41 в донорских клетках IL-10 hMDM представлено в **таблице 26**.

Таблица 26		
Антитело	Изотип	Фагоцитоз
PI-3010.25	IgG1	90%
PI-3010.15	IgG1	88%
PI-3030.41	IgG1	50%

[0234] PI-3010.25 и PI-3010.15 показали более последовательную индукцию фагоцитоза у нескольких доноров, когда hDMM были поляризованы с помощью IL-10.

Пример 10: Эффективность монотерапии in vivo антителами к MARCO мыши в модели EMT6

[0235] Способы

[0236] Опухолевые клетки рака молочной железы EMT6 (1×10^6 клеток на мышь) имплантировали на 0 день, и введение препарата (10 мг/кг; Q5dx4; внутривентриально) начинали, когда средний объем опухолей достигал ~90 мм³. Животным вводили дозы препарата внутривентриально каждые 5 дней, всего четыре дозы. Объемы опухолей отслеживали с течением времени и представляли в виде средних значений по группе, отдельных объемов опухолей в конце исследования или в виде %TGI.

[0237] Результаты

[0238] PI-3008 продемонстрировало противоопухолевую активность в качестве отдельного агента в модели EMT6 (Фиг. 36). В некоторых группах было достигнуто не более 20% полного ответа (CR) (ответившие на лечение животные).

Пример 11: Эффективность монотерапии in vivo антителами к MARCO мыши в модели E0771

[0239] Способы

[0240] Сингенная мышинная модель E0771

[0241] Исследования на мышах проводили под руководством и с одобрения Институционального комитета по содержанию и использованию животных Explora BioLabs, Южный Сан-Франциско, штат Калифорния.

[0242] Восемью-десятидневным самкам мышей C57/BL6 (Taconic) имплантировали субконфлюентные клетки E0771 (ATCC), которые находились в лог-фазе роста. Один миллион опухолевых клеток, ресуспендированных в бессывороточной среде с матригелем, имплантировали ортотопически в жировую ткань молочных желез мышей под анестезией изофлураном. Когда размер большинства опухолей составлял 110-120 кубических миллиметров (мм³), перед началом лечения мышей рандомизировали в группы лечения (PI-3008-AB и PI-0002 изотипа mIgG2a).

[0243] ФД исследование

[0244] Мышам, рандомизированным на 2 группы, внутрибрюшинно вводили 10 мг/кг PI-3008-AB или PI-0002-AB (изотип) в расчете на среднюю массу тела для каждой группы. Объем опухоли рассчитывали по формуле $[длина \times (ширина)^2]/2$ после измерения двух ортогональных диаметров с помощью цифровых штангенциркулей. В трех разных временных точках (2 дня после 1 дозы, 5 дней после 1 дозы, 24 часа после второй дозы Q5dx2) по 15 мышей на группу умерщвляли и отбирали опухоль, селезенку и кровь. 9 животных использовали для анализа опухолей и селезенки методом проточной цитометрии, а 6 мышей использовали для ИГХ оценки опухолей и селезенки. Объемы опухолей отслеживали с течением времени и представляли в виде средних значений по группе, отдельных объемов опухолей в конце исследования или в виде %TGI.

[0245] *Эффективность эффекторно нефункциональных антител*

[0246] Эффекторно нефункциональное антитело к MARCO, PI-3021 (PI-3008 с мутацией N297A), также оценивали в модели E0771. Мышам вводили дозы, как описано в Примере 4. Вкратце, 10 мышей в группе, внутрибрюшинное введение препарата начинали, когда объемы опухолей составляли $\sim 100 \text{ мм}^3$. Дозирование включало 10 мг/кг; Q5dx4. Использовали изотипы mIgG2a как PI-3008, так и эффекторно нефункционального PI-3021. Также использовали антитело к PD-1.

[0247] *ФК/ФД/эффективность в модели сингенных мышей E0771*

[0248] Для определения взаимосвязей ФК-ФД-эффективность использовали ортотопическую модель рака молочной железы E0771, поскольку PI-3008 продемонстрировало эффективность монотерапии в этой модели. Дизайн исследования включал группу «ФД», в которой опухоли и селезенки отбирали через 24 часа после второй дозы, и группу «ФК» для определения уровней PI-3008 в сыворотке. Схема временной шкалы исследования показана на **Фиг. 39А**.

[0249] Самкам мышей C57BL/6 вводили в жировую ткань молочных желез сингенные опухолевые клетки E0771 (5×10^5 клеток на мышшь) на 0 день, а введение доз PI-3008 или изотипических контролей (10 мг/кг, N=10/группа) начинали, когда объемы опухолей достигали в среднем $\sim 100 \text{ мм}^3$. Животным вводили дозы препарата внутрибрюшинно каждые 5 дней, всего четыре дозы. У подмножества животных отбирали образцы через 24 часа после второй дозы для оценки изменений ФД в опухолях и селезенках. Дополнительное определение показателей ФД проводили через 2 дня и 5 дней после введения первой дозы. Отбирали образцы тканей опухоли, селезенки и крови с помощью Luminex и проточной цитометрии.

[0250] У остальных животных отслеживали противоопухолевую эффективность, и в конце исследования у них отбирали образцы для анализа экспозиции лекарственного средства. ФД анализы конечной точки включали профилирование опухолей и селезенки с помощью проточной цитометрии для определения изменений в составе миелоидных и лимфоидных клеток, измерение цитокинов/хемокинов в опухоли и селезенке, а также оценку частоты CD8 Т-клеток, NK-клеток, MARCO-клеток и CD19 В-клеток и распределение в ткани по ИГХ (моноплексный и мультиплексный).

[0251] *Анализ методом проточной цитометрии*

[0252] Ткань опухоли мыши собирали и помещали в охлажденную льдом среду RPMI-1640 (Invitrogen). Опухоли подвергали ферментативной диссоциации с использованием набора Mouse Tumor Dissociation Kit (Miltenyi) в соответствии с рекомендациями производителя. После диссоциации суспензии отдельных клеток осаждали и собирали супернатант опухоли, центрифугировали на высокой скорости для удаления нерастворимого материала, ферментативно инактивировали с использованием коктейля ингибиторов протеазы Halt™ (Thermo Scientific) и сразу же замораживали при -80°C до проведения последующего анализа. Клеточные осадки ресуспендировали в среде для окрашивания (DPBS/1% BSA/2 mM EDTA) и пропускали через фильтр с диаметром пор 100 мкм для удаления недиссоциированного материала. Суспензии отдельных клеток подсчитывали на ViCell XR (Beckman Coulter) и высевали в 96-луночные планшеты с V-образным дном для окрашивания для проточной цитометрии.

[0253] Клетки инкубировали с Zombie NIR (BioLegend) с последующим блокированием FcγR с использованием комбинированного коктейля TruStain FcX PLUS (Biolegend), сыворотки мыши, сыворотки крысы, сыворотки хомяка (Jackson Immuno Research), приготовленных в блокаторе Fc-рецепторов (Innovex). Белки клеточной поверхности окрашивали в течение 30 минут на льду, после чего следовала либо стадия вторичного окрашивания, либо фиксация 1% PFA в течение ночи при 4°C. Для окрашивания внутриклеточных белков клетки фиксировали и пермеабелизировали с помощью набора буферов для окрашивания FoxP3/фактора транскрипции (Thermo Fisher Scientific). Внутриклеточные антитела готовили в буфере для пермеабелизации с 2% сывороткой крысы и клетки инкубировали по меньшей мере 30 минут при комнатной температуре. Клетки анализировали на приборе Attune NXT (ThermoFisher). Анализ методом проточной цитометрии проводили с использованием FlowJo (Becton Dickinson).

[0254] Антитела для проточной цитометрии, используемые для каждой панели, описаны в **таблице 27** ниже и были приготовлены путем добавления соответствующих антител к буферу для FACS, содержащему Ca²⁺/Mg²⁺ PBS и 2% FBS.

Таблица 27	
Популяция иммунных клеток	Маркеры клеточной поверхности
Нейтрофилы	Ly6G+
Моноциты	Ly6G-/Ly6C+ и суб-гейтирование по МНСII-, МНСII ^{int} , МНСII ^{high}
ТАМ	CD11b+/F4/80+ и суб-гейтирование по МНСII-, МНСII ^{int} , МНСII ^{high}
DC	F4/80-/CD11c+/МНС-II+
CD4+ Т-клетка	CD90.2+/CD8-/CD4
CD8+ Т-клетка	CD90.2+/CD4-/CD8+

НК-клетка	CD90.2+/CD4-/CD8-/NK1.1+
В-клетки памяти	CD90.2- /CD45R+/CD19+
В-клетки плазмы	CD90.2- /CD45R+/CD19 ^{Low} /Blimp1+
В-клетки маргинальной зоны	CD90.2- /CD45R+/CD21+/CD35 ^{mid} /CD23+
Фолликулярные В-клетки	CD90.2- /CD45R+/CD21+/CD35 ^{high}
Макрофаги селезенки	CD11b+/F4/80+ и суб-гейтирование по МНСII- и МНСII+
Макрофаги красной пульпы	CD11b+/F4/80+/CD206+
Макрофаги маргинальной зоны	CD11b ^{int} /F480+ И/или CD11 CD11b ^{int} /F480+/TIM4+
Макрофаги, отличные от макрофагов маргинальной зоны	Все CD11b/F480+ популяции, за исключением CD11b ^{int} /F480+ маргинальной зоны

[0255] *Анализ занятости рецепторов (RO)*

[0256] Для панелей антител для проточной цитометрии миелоидных клеток опухоли/селезенки и крови к окрашивающему коктейлю добавляли антитело PI-3008, конъюгированное с PE, от BioLegend, или mIgG2a-PE от BioLegend в концентрации 10 мкг/мл для оценки занятости рецепторов (RO) в различные миелоидных клетках в опухолях, селезенке и крови.

[0257] *Концентрации в сыворотке in vivo*

[0258] Уровни в сыворотке мкАт к MARCO мыши определяли с использованием стандартного формата ИФА связывания лиганда (LBA) с His-меченной слитой белковой конструкции из рекомбинантного внеклеточного домена (ВКД) MARCO мыши. Уровни мкАт PI-3008 в сыворотке мышей с опухолями CT26 оценивали в нескольких исследованиях и в различные моменты времени. Для ФД исследования PI-3008 измеряли через 4 часа после первой внутривенной дозы и через 4 часа после второй внутривенной дозы с интервалом в 7 дней.

[0259] *Для сравнения также оценивали уровни антител в сыворотке in vivo в комбинированных исследованиях CT26 с антителом к MARCO и антителом к PD-1. PI-3008 и PD-1 вводили внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг или 5 мг/кг по схеме Q5d X4 в*

исследовании эффективности СТ26 (Пример 4). Образцы сыворотки для определения концентрации PI-3008 и PD-1 собирали перед введением третьей дозы (до введения дозы) и через 24 часа после последней дозы (после введения дозы).

[0260] *Секреция цитокинов и хемокинов мышци с помощью Luminex*

[0261] Мышиную плазму, супернатанты селезенки или супернатанты опухоли оценивали на уровне цитокинов с использованием мультиплексного иммуноанализа ProcartaPlex от ThermoFisher Scientific (кат. № PPX-25-MX47WJ7). В наборе используются частицы с цветовой кодировкой для измерения уровней нескольких цитокинов с помощью технологии Luminex xMAP. Частицы окрашены изнутри различными пропорциями красных и инфракрасных флуорофоров, которые соответствуют различным областям спектра. Для эксперимента в планшет сначала добавляют 50 мкл магнитных частиц для захвата. Образцы для анализа или стандарты набора добавляли по 25 мкл на объем лунки и добавляли равное количество универсального буфера для анализа для коррекции состава матрицы. После двухчасовой инкубации при комнатной температуре частицы собирают на магнитной планшете и затем промывают с последующим добавлением 25 мкл/лунку детектирующего антитела. После одночасовой инкубации при комнатной температуре частицы снова промывали и добавляли стрептавидин-фикоэритрин (SAPE) по 50 мкл/лунка на лунку. После последней одночасовой инкубации частицы промывали и добавляли 120 мкл/лунка буфера для считывания. Планшет анализировали на приборе Luminex 200. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Luminex Xponent v4.3, и уровни анализируемых веществ в мкг нормализовали к массе опухоли или селезенки. Данные по цитокинам/хемокинам представлены в виде кратности изменения в супернатантах, обработанных PI-3008, по сравнению со средним значением для супернатантов, обработанных изотипом, для каждого анализируемого вещества.

[0262] *Обнаружение IgG/IgM в тканях и сыворотке мышцей*

[0263] 25 мкл/лунку Diluent 100 (MSD, кат. № R50AA-4) добавляли в планшет, предварительно покрытый захватывающими антителами (MSD, кат. № K15183B-1 и K15203D-1). Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин при энергичном встряхивании. Стандарты (Mouse Isotyping Panel 1, MSD, кат. № K15183B-1) и образцы разводили в Diluent 100 (MSD, кат. № R50AA-4) и добавляли в планшет с покрытием. Планшет инкубировали в течение 120 мин при энергичном встряхивании при комнатной температуре и промывали. В каждую лунку добавляли 25 мкл 1X раствора антител для детекции и планшет инкубировали в течение 120 мин при энергичном встряхивании при комнатной температуре. Планшет промывали и в планшет MSD добавляли 2x буфер для считывания (MSD, кат. № R92TC-3). Планшет считывали на MSD Sector Imager. Диапазон результатов количественного анализа IgG/IgM для набора Mouse Isotyping Panel составлял от 24 пг/мл до 100000 пг/мл. НПКО составлял 97,7 пг/мл, а ВПКО составлял 100000 пг/мл. Уровни IgG в образцах тканей мышци варьировались от 0,8 мкг/мл до 1 мкг/мл. Уровни IgM в образцах ткани мышци варьировались от 0,2 мкг/мл до 1 мкг/мл. Уровни IgG в образцах сыворотки мышцей варьировались от 41 мкг/мл до 56

мкг/мл. Уровни IgM в образцах сыворотки мышей варьировались от 15 мкг/мл до 24 мкг/мл.

[0264] *Гистология тканей мыши и окрашивание антител в моноплексном ИГХ анализе DAB*

[0265] Животных подвергали эвтаназии в соответствии с одобренной учреждением стандартной операционной процедурой (СОП) для удушения CO₂ с последующим смещением шейного отдела позвоночника. Животных опрыскивали 70% этанолом для обеспечения стерильности и снижения количества аллергенов в воздухе. Затем опухоли и селезенки отбирали в 10%-ный нейтральный забуференный формалин (VWR, 16004). Формалин удаляли через 24 часа, а опухоли и селезенку переносили в 70% этанол.

[0266] Все опухоли и селезенки отправляли компании Cureline (Брисбен, штат Калифорния). Компания Cureline выполнила гистологию на основе своей институциональной СОП и полностью автоматизированного рабочего процесса. Опухоли большего размера разрезали пополам, а опухоли меньшего размера оставляли нетронутыми, а затем подвергали обработке, заливали в парафин и разрезали на тонкие срезы толщиной 5 мкм. Селезенки разрезали в поперечном сечении, затем подвергали обработке, заливали в парафин и разрезали на тонкие срезы толщиной 3 мкм.

[0267] Иммуногистохимию (ИГХ) CD8a (Cell Signaling, 98941S) выполняли с использованием прибора для автоматического окрашивания Bond Rx (Leica Biosystems) с индуцированной нагреванием демаскировкой эпитопов (HIER) при pH 9,0 в течение 20 минут. Первичное антитело к CD8a (98941S, Cell Signaling Technologies, разбавленное для использования до 3,2 мкг/мл) и Bond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems) использовали в соответствии с протоколом производителя. Окрашивали ткани как селезенки, так и опухоли.

[0268] ИГХ Marco (Abcam, ab239369) выполняли с использованием прибора для автоматического окрашивания Bond Rx (Leica Biosystems) с HIER при pH 6,0 в течение 20 минут. Первичное антитело к Marco (ab239369, Abcam, разбавленное для использования до 1,5 мкг/мл) и Bond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems) использовали в соответствии с протоколом производителя. Окрашивали ткани как селезенки, так и опухоли.

[0269] ИГХ NCR1 выполняли с использованием прибора для автоматического окрашивания Bond Rx (Leica Biosystems) с HIER при pH 9,0 в течение 20 минут. Первичное антитело к NCR1 (ab233558, Abcam, разбавленное для использования до 1,25 мкг/мл) и Bond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems) использовали в соответствии с протоколом производителя. Окрашивали ткани как селезенки, так и опухоли.

[0270] ИГХ CD19 (Abcam, ab245235) выполняли с использованием прибора для автоматического окрашивания Bond Rx (Leica Biosystems) с HIER при pH 9,0 в течение 20 минут. Первичное антитело к CD19 (ab245235, Abcam, разбавленное для использования до 0,91 мкг/мл) и Bond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems) использовали в

соответствии с протоколом производителя. Окрашивали ткани как селезенки, так и опухоли.

[0271] ИГХ CD206 (MRC1; Invitrogen, PA5-114370) выполняли с использованием прибора для автоматического окрашивания Bond Rx (Leica Biosystems) с HIER при pH 9,0 в течение 20 минут. Первичное антитело к CD206 (PA5-114370, ThermoFisher Scientific, разведенное для использования до 0,5 мкг/мл для селезенки и до 1 мкг/мл для опухоли) и Bond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems) использовали в соответствии с протоколом производителя. Окрашивали ткани как селезенки, так и опухоли.

[0272] После окрашивания срезы промывали в dH₂O и заливали ксиленом и монтирующей средой Cytoseal XYL (ThermoFisher Scientific). Сканирование всего препарата (40x) выполняли на Aperio AT2 (Leica Biosystems), и все сканы размещались в электронном виде на веб-странице Pionyr Pathcore.

[0273] *Количественная оценка CD8a, MARCO, NCR1, CD19 и CD206*

[0274] Срезы тканей анализировали с использованием программного обеспечения для анализа изображений HALO v3.3.2541.202 (Indica Labs). Изображения были импортированы в базу данных HALO, а инструмент аннотирования кистью использовали для определения области анализа (обозначенной слоем 1). Были включены все области тканей селезенки и опухоли, исключая любые артефактные окрашивания, складки, некротические области, стекла или участки кожи с помощью инструмента аннотирования ножницами. ИГХ анализ выполняли для каждого аннотированного слоя для всех маркеров по отдельности (CD8a, MARCO, NCR1, CD19 и CD206) с использованием алгоритма Indica Labs - Area Quantification v2.1.11. Алгоритм был настроен на обнаружение синих пикселей от окраски гематоксилином и коричневых пикселей от ИГХ окраски DAB. Данные экспортировали в виде файла Excel, а процентное значение для положительного окрашивания DAB по всей аннотированной площади получали для каждого отдельного маркера и использовали для построения данных в Prism.

[0275] *Мультиплексное иммунофлуоресцентное (ИФ) окрашивание и анализ изображений*

[0276] Фиксированные формалином и заключенные в парафин срезы селезенки и опухолей мышей окрашивали с использованием 5-плексных иммунофлуоресцентных панелей. Селезенки от 6 мышей, получавших PI-3008, и 6 мышей, получавших изотип, и опухоли от 4 мышей, получавших PI-3008, и 4 мышей, получавших изотип, окрашивали и анализировали. Все антитела для ИГХ, включенные в мультиплексную панель для оценки селезенки мыши и панель для оценки мышинной опухоли (E0771), сначала оптимизировали с помощью DAB для ИГХ на фиксированных формалином и заключенных в парафин срезах селезенки и опухоли мыши (опухоли E0771). Затем при разработке мультиплексных панелей учитывались оптимальные концентрации антител и условия окрашивания. Использовали следующие антитела: CD8a от Cell Signaling, 98941S; MARCO из Abcam, ab239369; CD19 от Abcam, ab245235, CD206 (MRC1) от Invitrogen; PA5-114370; NCR1 от Abcam ab233558; и ядра от Акоюа, артикул FP1490.

[0277] Срезы подвергали 4 последовательным циклам окрашивания каждым первичным антителом с последующим вторичным полимером, конъюгированным с HRP, и усилением сигнала с использованием флуорофоров TSA-Opal. После каждого раунда окрашивания выполняли стадию индуцированной нагреванием демаскировки эпитопов для удаления комплексов первичное антитело-вторичный полимер-HRP. Затем препараты контрастно окрашивали Spectral DAPI и монтировали с использованием монтирующей среды для предотвращения выцветанию.

[0278] Окрашенные препараты визуализировали с использованием системы визуализации Vectra 3 (Akoya Biosciences). После сканирования при малом увеличении представляющей интерес области (ROI) были сделаны метки с помощью программы просмотра Phenochart (Akoya Bioscience), и эти метки впоследствии были отсканированы при более высоком разрешении (20x). Четыре метки на срез селезенки были отобраны путем выбора областей, в которые были включены репрезентативные области белой пульпы, красной пульпы и маргинальной зоны. В срезах опухоли были выбраны метки, покрывающие большую часть области опухоли, специально выбирая краевые и центральные области, чтобы облегчить сравнительный анализ этих областей опухоли. Полученные файлы изображений ROI открывали в InForm (Akoya Biosciences) и не смешивали спектрально с последующим удалением автофлуоресцентного окрашивания. Анализ изображений выполняли в InForm, сначала вручную сегментируя ткань селезенки на красную пульпу, белую пульпу и маргинальную зону. Из анализа исключали области стекла. Опухолевые ткани сегментировали вручную, чтобы включить только опухоль и исключить кожу, стекло и некротические области. Ядра идентифицировали и сегментировали с использованием контрастного красителя DAPI, после чего проводили обучение алгоритма фенотипирования клеток для идентификации представляющих интерес типов клеток. Затем данные, сгенерированные InForm, были загружены в R studio и с помощью пакета phenoptrReports (Akoya Biosciences), из получены данные, включающие количество клеток, процентное содержание клеток, плотность клеток и анализ ближайших соседей для различных компартментов ткани

[0279] Результаты

[0280] PI-3008-AB также продемонстрировало противоопухолевую активность в качестве отдельного агента в ортотопической модели E0771 по сравнению с изотипическими контрольными антителами (**Фиг. 37**). В конце исследования на 33-й день у мышей, которым вводили PI-3008, наблюдалось статистически значимое уменьшение объема опухоли по сравнению с изотипическими контролями ($p=0,0037$) (**Фиг. 38A**). На **Фиг. 38B** для изотипического антитела и PI-3008 показан процент ингибирования роста опухоли (TGI).

[0281] Кроме того, как PI-3008, так и эффекторно нефункциональное PI вызывали сходную активность в виде отдельного агента в ортотопической модели E0771 (**Фиг. 38C**). На отдельных панелях показан объем опухоли у отдельных мышей после лечения указанным антителом или изотипическим контролем. На верхней правой панели показаны

объемы опухоли у каждой мыши на 28-й день. На нижней правой панели показана концентрация антител в сыворотке для PI-3008 и PI-3021.

[0282] *Анализ ФК-ФД-эффективности*

[0283] Исследование ФК-ФД *in vivo* в E0771 показало, что PI-3008 продемонстрировало активность одного агента по сравнению с изотипическим антителом после 4 доз лечения. Значительные различия в размере опухоли наблюдались, начиная со второй дозы (**Фиг. 39В**). Объемы отдельных опухолей у мышей, получавших изотипический контроль, представлены на **Фиг. 39С**. Объемы отдельных опухолей у мышей, получавших PI-3008, представлены на **Фиг. 39D**. Конечные объемы опухоли на 28-й день представлены на **Фиг. 39Е**. Кроме того, уровни PI-3008 в сыворотке сохраняли устойчивую экспозицию до конца исследования (**Фиг. 39F**).

[0284] Концентрации антитела к PD-1 в сыворотке при комбинировании с PI-3008 также находились в ожидаемом диапазоне экспозиции, как это наблюдалось в предыдущих исследованиях при дозировании в виде отдельного агента (**Фиг. 40А и 40В**). На **Фиг. 40А** представлены концентрации PI-3008 в экспериментах по монотерапии и комбинированной терапии с антителом к PD-1, тогда как на **Фиг. 40В** представлены концентрации PD-1 в экспериментах по комбинированной терапии.

[0285] PI-3008 также активировало внутриопухолевый иммунитет в модели E0771, о чем свидетельствует увеличение CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток в ТМЕ после введения антитела. На **Фиг. 41А** представлены ИГХ-изображения CD8 Т-клеток и NCR1 (NK-клеток), окрашенных DAB после введения изотипического контроля или PI-3008. На **Фиг. 41В** представлено количественное определение цитотоксических CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток в области опухоли с помощью анализа изображений HALO для ИГХ окрашивания. PI-3008 способствовало изменениям ТМЕ, свидетельствующим об улучшении противоопухолевого ответа. Антитело к MARCO увеличивало количество MHCII^{High} Ly6C⁺ моноцитов, инфильтрацию DC и NK-клеток NK1.1 в ТМЕ согласно проточной цитометрии (**Фиг. 41С**). Не желая быть связанными какой-либо теорией, увеличение количества этих клеток может усиливать активацию внутриопухолевого иммунитета и улучшать презентацию антигена в ТМЕ.

[0286] Увеличение количества CD8⁺ Т-клеток и NK-клеток в ТМЕ также наблюдали с помощью мультиплексного ИФ. На **Фиг. 41D** представлена количественная оценка CD206⁺ клеток, MARCO⁺ клеток, NCR1⁺ клеток и CD8a⁺ клеток на краю опухоли, плотность клеток указанной клетки на краю опухоли, медианного расстояния до ближайшего соседа от CD206 и указанных типов клеток, и медиана расстояния до ближайшего соседа от MARCO и указанных типов клеток у мышей после лечения изотипическим антителом или PI-3008. Данные для изотипического антитела представлены слева от каждой пары данных с круглыми значками, а данные для PI-3008 представлены справа от каждой пары данных с ромбовидными значками. Этот мультиплексный анализ продемонстрировал, что количество NK-клеток и CD8Т-клеток увеличивается в опухолях после лечения антителом к MARCO. Пространственное

картирование показало более близкое расстояние между CD8⁺ Т-клетками и NK-клетками с MARCO⁺-клетками в ТМЕ в опухолях животных, получавших PI-3008, по сравнению с изотипом.

[0287] Также оценивали провоспалительные цитокины и хемокины, индуцированные PI-3008, в супернатантах опухоли модели E0771 (**Фиг. 42А**). Обработка PI-3008 индуцировала цитокины и хемокины в супернатантах опухоли в модели E0771. В модели E0771 индуцировались те же самые цитокины, что идентифицированы с помощью секвенирования РНК в исследовании СТ26. Цитокины, связанные с активацией Т-клеток и активацией NK-клеток, также наблюдали на 1 день после введения дозы 2 в супернатантах опухоли (**Фиг. 42В**).

[0288] MARCO в высокой степени экспрессируется в селезенке, прежде всего в макрофагах маргинальной зоны, моноцитах и дендритных клетках (**Фиг. 43**). Образцы мышей, получавших лечение изотипическим антителом, представлены слева от каждой пары образцов, образцы мышей, получавших лечение антителом PI-3008, представлены справа от каждой пары образцов. Данные на **Фиг. 43** отражают дельту гСИФ между конъюгированным с PE PI-3008 и конъюгированным с PE изотипическим антителом mIgG2a, используемым в анализе методом проточной цитометрии. В этом анализе антитело к MARCO для проточной цитометрии конкурирует с ранее введенным терапевтическим PI-3008 за связывание с MARCO⁺ клетками в образцах. Таким образом, в образцах, полученных от мышей, получавших PI-3008, ожидалось и наблюдалось захват рецепторов и конкуренция, представленные справа от пар образцов, о чем свидетельствуют низкие уровни дельта гСИФ, указывающие на низкое связывание антитела к MARCO в анализе на основе проточной цитометрии (**Фиг. 43**). В образцах мышей, получавших изотип, представленных слева от пар образцов, не наблюдалось захвата рецепторов и конкуренции за окрашивание MARCO в анализе на основе проточной цитометрии, что подтверждается высокими уровнями дельта гСИФ, указывающими на высокое связывание антитела к MARCO в анализе на основе проточной цитометрии (**Фиг. 43**). Более высокая RO и более низкая гСИФ в образцах, обработанных PI-3008, по сравнению с образцами, обработанными изотипом, для каждой целевой миелоидной популяции подтвердили экспрессию MARCO в каждой конкретной популяции. Таким образом, группа, получавшая изотип, демонстрирует экспрессию MARCO (с использованием антитела PI-3008 для проточной цитометрии) для определения уровней MARCO в целевой популяции миелоидных клеток, когда терапевтическое антитело отсутствует. Экспрессию MARCO наблюдали на дендритных клетках, CD11b^{int}F480⁺ макрофагах, TM4⁺ макрофагах маргинальной зоны, Ly6C⁺ МНСII^{High} моноцитах и Ly6C⁺ МНСII^{mid} моноцитах. Экспрессия MARCO была самой высокой на макрофагах маргинальной зоны, идентифицированных как CD11b^{int}F480⁺ и TIM4⁺ макрофаги маргинальной зоны. MARCO также экспрессировался на МНСII⁺ моноцитах. Занятость рецепторов в этих популяциях миелоидных клеток была достигнута в группе, получавшей лечение антителом PI-3008 (через 24 часа после 2-й дозы).

[0289] В целом, **Фиг. 43** показано, что дельта гСИФ в группе, получавшей изотип, показала экспрессию рецептора MARCO в селезенке, а дельта гСИФ в группах, получавших PI-3008, подтвердила, что PI-3008 связывался с MARCO-положительными миелоидными клетками и, следовательно, не мог быть обнаружен с помощью антитела PI-3008 для проточной цитометрии. Образцы мышей, получавших лечение изотипическим антителом, представлены слева от каждой пары образцов, образцы мышей, получавших лечение антителом PI-3008, представлены справа от каждой пары образцов.

[0290] PI-3008 не влияло на популяции миелоидных клеток в селезенке, но потенциально влияло на В-клетки через 24 часа после второй дозы. Как показано на **Фиг. 44А, 44В, и 44С** лечение PI-3008 не изменяет популяции MARCO+ миелоидных или лимфоидных клеток в селезенке. Однако лечение PI-3008 действительно приводило к снижению количества CD19+ В-клеток и В-клеток плазмы в селезенке (**Фиг. 44D**). Образцы мышей, получавших лечение изотипическим антителом, представлены слева от каждой пары образцов, образцы мышей, получавших лечение антителом PI-3008, представлены справа от каждой пары образцов.

[0291] Лечение PI-3008 снижало продукцию IgM и увеличивало продукцию IgG в селезенке и сыворотке после 2 дозы (**Фиг. 45**).

[0292] Экспрессия MARCO на макрофагах маргинальной зоны снижалась при лечении PI-3008 в селезенке по данным ИГХ (**Фиг. 46**). MARCO+ клетки в селезенке оценивали при второй дозе и в конце исследования. У мышей PI-3008 было обнаружено сниженное количество MARCO+ макрофагов маргинальной зоны по сравнению с мышами, получавшими лечение изотипическими антителами. Моноплексное ИГХ также использовали для определения изменений в селезенке после лечения PI-3008 (**Фиг. 47А-Д**). Увеличение количества CD8+ Т-клеток и NK-клеток наблюдали на общей площади после лечения PI-3008 (**Фиг. 47А и 47В**). Популяция CD19+ клеток была вариабельной, и ее было сложно измерить с помощью ИГХ (**Фиг. 47С**). Значительное увеличение CD206 (макрофагов красной пульпы) наблюдали после лечения PI-3008 (**Фиг. 47D**). Образцы мышей, получавших лечение изотипическим антителом, представлены слева от каждой пары образцов, образцы мышей, получавших лечение антителом PI-3008, представлены справа от каждой пары образцов.

[0293] Процент положительных клеток на тканевый компартмент после лечения изотипическим антителом и PI-3008 определяли с помощью анализа изображений в мультиплексном ИФ (**Фиг. 48А-Д**). Наблюдали уменьшение MARCO в красной пульпе после терапии PI-3008 и на общей площади (**Фиг. 48А**). Небольшое уменьшение CD19 во всех тканевых компартментах наблюдали на общей площади после лечения PI-3008 (**Фиг. 48В**). После лечения PI-3008 наблюдали увеличение CD8a во всех тканевых компартментах (**Фиг. 48С**). Небольшое увеличение CD206 в красной пульпе наблюдали после лечения PI-3008 (**Фиг. 48D**). Образцы мышей, получавших лечение изотипическим антителом, представлены слева от каждой пары образцов, образцы мышей, получавших лечение антителом PI-3008, представлены справа от каждой пары образцов.

[0294] *ФД анализ образцов на 2-й и 5-й день*

[0295] Расщепленные супернатанты и плазма из опухолей, селезенки и крови, взятые через 2 и 5 дней после лечения антителами, анализировали с помощью Luminex. Лечение антителом к MARCO индуцировало цитокины и хемокины в супернатантах опухоли в модели E0771 в ранние моменты времени (**Фиг. 58** и **Фиг. 59**). Образцы со 2 дня показаны справа, образцы с 5 дня показаны слева. Изменения в уровнях цитокинов и хемокинов наблюдались в обе временные точки, уровни G-CSF, IL27, IL10 и TNF α повышались на 2-й день, уровни IL12p70, IL10, IL6 и IL4 повышались на 5-й день. Уровни хемокинов, участвующих в миграции и хемотаксисе, повышались в селезенке на 2-й день после введения первой дозы антител.

[0296] Лечение антителом к MARCO также модулировало продукцию IgG1 в опухоли мыши (**таблица 28**).

Таблица 28						
2 день						
	IgA	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgM	Общий IgG
Изотип (мкг/мл)	1,22	14,67	2,39	9,58	4,83	26,65
PI-3008 (мкг/мл)	1,12	19,42	2,48	8,48	4,57	30,38
5 день						
Изотип (мкг/мл)	1,10	20,61	1,69	13,56	6,54	35,86
PI-3008 (мкг/мл)	1,20	15,52	2,25	12,34	6,59	30,12

[0297] Лечение антителом к MARCO снижало продукцию IgM на 2-й день, а уровень IgG1 несколько снижался на 5-й день в селезенке (**таблица 29**).

Таблица 29						
2 день						
	IgA	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgM	Общий IgG
Изотип (мкг/мл)	4,36	15,50	5,08	12,73	43,58	33,31
PI-3008 (мкг/мл)	3,65	14,02	3,18	10,69	28,13	27,88
5 день						
Изотип (мкг/мл)	1,90	14,58	1,46	7,74	18,37	23,77

PI-3008 (мкг/мл)	2,43	10,99	2,01	9,63	17,22	22,62
----------------------------	------	-------	------	------	-------	-------

[0298] Лечение антителом к MARCO снижало IgG1 и IgG2b в плазме после лечения PI-3008 (таблица 30).

Таблица 30						
5 день						
	IgA	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgM	Общий IgG
Изотип (мкг/мл)	21	16	13	45	6	74
PI-3008 (мкг/мл)	18	6	13	37	6	56

[0299] Во-первых, миелоидные клетки опухоли оценивали на 2-й и 5-й дни после однократного введения антитела к MARCO. Антитело к MARCO влияло на общее количество TAM (уменьшение, **Фиг. 60**) и моноцитов (увеличение, **Фиг. 61**) в опухолях на 2-й день и 5-й день. Антитело к MARCO также перепрограммировало TAM с иммуносупрессивного МНСII⁻ на провоспалительный МНСII⁺ на 2-й день (**Фиг. 60**) и моноциты с иммуносупрессивного МНСII⁻ на провоспалительный МНСII⁺ на 2-й день (**Фиг. 61**).

[0300] Антитело к MARCO повышало количество CD11c⁺ МНСII⁺ DC на 2-й и 5-й дни и немного снижало количество LybG⁺ нейтрофилов на 2-й и 5-й дни (**Фиг. 62**). Таким образом, в миелоидных клетках опухоли антитело к MARCO увеличивало провоспалительные моноциты и DC и уменьшало опухолеассоциированные нейтрофилы (TAN) и TAM. Кроме того, через 2 дня после первой дозы антитела к MARCO перепрограммировало МНСII⁻TAM в МНСII⁺ TAM, а МНСII⁻ моноциты в МНСII⁺ моноциты.

[0301] Затем лимфоидные клетки опухоли оценивали на 2 и 5 дни после введения одной дозы антитела к MARCO. Антитело к MARCO увеличивало CD8⁺ Т-клетки и CD4⁺ Т-клетки на 2 и 5 день в опухолях (**Фиг. 63**). Антитело к MARCO также увеличивало количество NK-клеток NK1.1 на 5-й день в опухолях (**Фиг. 63**).

[0302] Затем лимфоидные клетки селезенки оценивали на 2 и 5 дни после введения 1 дозы антитела к MARCO. Антитело к MARCO снижало количество CD19⁺ В-клеток в оба дня и не изменяло количество В-клеток плазмы (**Фиг. 64**, данные не показаны). Антитело к MARCO увеличивало количество фолликулярных В-клеток и уменьшало количество В-клеток маргинальной зоны на 5-й день в селезенке (**Фиг. 64**). Антитело к MARCO влияло на популяции В-клеток в селезенке за счет уменьшения количества CD19⁺ В-клеток, уменьшения количества В-клеток маргинальной зоны и увеличения количества фолликулярных В-клеток на 5-й день (**Фиг. 64**). Антитела к MARCO повышали CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетки селезенки в эти два дня (**Фиг. 65** и данные не

показаны). Антитело к MARCO не изменяло NK-клетки NK1.1 на 2-й день, но увеличивало их количество на 5-й день (Фиг. 65, данные не показаны). Антитело к MARCO также повышало DC селезенки и не изменяло уровни нейтрофилов в селезенке (Фиг. 65).

[0303] Миелоидные клетки селезенки также оценивали на 5-й день после введения одной дозы антитела к MARCO. Антитело к MARCO снижало количество МНСII-моноцитов и увеличивало количество МНСII+ моноцитов (с высоким и средним уровнем экспрессии) на 5-й день путем субтипирования Ly6C+ моноцитов в клетки с различным уровнем экспрессии МНСII (Фиг. 66). Антитело к MARCO повышало общее количество макрофагов в селезенке на 2-й день и 5-й день, включая макрофаги красной пульпы (Фиг. 67 и данные не показаны). Антитело к MARCO также увеличивало количество макрофагов маргинальной зоны (MZM) на 5-й день, МНСII+ DC и увеличивало количество макрофагов, отличных от макрофагов маргинальной зоны, на 5-й день (Фиг. 67 и 68).

[0304] Кровь также анализировали с помощью проточной цитометрии на 5-й день. Наблюдали небольшое снижение Ly6C^{high} моноцитов и DC на 5-й день и увеличение количества T-клеток. Никаких изменений в B-клетках не наблюдалось. (Фиг. 69).

[0305] Также оценивали экспрессию MARCO и занятость рецепторов в селезенке мышей, опухолях E0771 и крови (Фиг. 70) на 5 день. Как показано на Фиг. 70, MARCO экспрессировался на высоких уровнях в селезенке, в частности, на макрофагах маргинальной зоны (MZ), гейтируемых по CD11b^{int} F480+ и TIM4+ макрофагов. MARCO не экспрессировался на макрофагах, отличных от макрофагов маргинальной зоны, (не-MZ), о чем свидетельствует окрашивание образцов на MARCO для изотипа mIgG2a с помощью проточной цитометрии, в котором антитело к MARCO для проточной цитометрии не конкурировало с предшествующим антителом к MARCO за связывание с клетками. MARCO экспрессировался на МНСII+ моноцитах (МНСII^{high} и МНСII^{inter}) и на DC. MARCO также экспрессировался на CD206+ макрофагах красной пульпы за пределами маргинальной зоны и на МНСII+ макрофагах. Занятость рецепторов терапевтическим антителом к MARCO была достигнута в положительных экспрессирующих MARCO клетках на Фиг. 70, перечисленных выше, о чем свидетельствует отсутствие окрашивания образцов на MARCO методом проточной цитометрии, в которых антитело к MARCO для проточной цитометрии превосходило предшествующее терапевтическое антитело к MARCO в отношении связывания с клетками.

[0306] В опухолях E0771 MARCO экспрессировался на низких уровнях внутри опухолей. Занятость рецепторов нельзя было точно измерить на 2-й день, но она была достигнута в моноцитах с высокой и средней экспрессией МНСII^{high}, МНСII+ DC; и как в МНСII+ TAM, так и в МНСII- TAM на 5-й день (Фиг. 70). На иммунных клетках крови экспрессии MARCO не наблюдалось (Фиг. 70).

[0307] В целом, PI-3008 индуцировало изменения подвижности и/или фагоцитоза в опухолях, о чем свидетельствует измененная экспрессия генов в цитоскелете, актине и мышцах, миграции и путях, ассоциированных с клеточной адгезией и миграцией. PI-3008 также индуцировало иммунную активацию, о чем свидетельствуют активация NK-клеток, активация Т-клеток и дифференцировка миелоидных клеток. В лимфатических узлах PI-3008 изменяло экспрессию генов в путях, ассоциированных с генами клеточного сигналинга, клеточной адгезии, цитоскелета и подвижности. В селезенке PI-3008 изменяет экспрессию генов в путях, ассоциированных с генами клеточного сигналинга, клеточной адгезией, цитоскелета, хемотаксиса и подвижности, а также с активацией В-клеток. Не желая быть связанными какой-либо теорией, в совокупности эти данные указывают на то, что антитела к MARCO активируют внутриопухолевый иммунитет, по меньшей мере, опосредуя реполяризацию MARCO+ миелоидных M2-подобных TAM в M1-подобные TAM и реполяризацию mMDSC в провоспалительные моноциты. Эта реполяризация приводит к продукции цитокинов, хемокинов и рецепторов активации, что, в свою очередь, приводит к активации Т- и NK-клеток. Реполяризация миелоидных M2-подобных TAM и mMDSC и активация Т- и NK-клеток затем приводит к разрушению опухоли, опосредованному NK-клетками, CD8-клетками и M1-подобными макрофагами. Кроме того, не ограничиваясь теорией, потенциальное связывание антитела к MARCO с макрофагами медуллярной связки (MCM) может вызывать изменения адгезии и подвижности в лимфатическом узле, а потенциальное связывание антитела к MARCO с макрофагами маргинальной зоны (MZM) в селезенке может привести к изменениям в адгезии и подвижности, что может привести к активации В-клеток.

Пример 12: Фармакодинамический анализ в модели CT26 in vivo

[0308] Способы

[0309] ФД исследование проводили на мышах с опухолью CT26. Самкам мышей BALB/c (Taconic) в возрасте от восьми до десяти недель имплантировали субконфлюэнтные клетки CT26.WT (ATCC, банк Pionug), которые находились в лог-фазе роста. Один миллион опухолевых клеток, ресуспендированных в бессывороточной среде, имплантировали подкожно в правый вентральный бок мышей под анестезией изофлураном. Для пилотного ФД исследования CT26 мышам с объемом опухоли 150-200 мм³ однократно внутривенно вводили 10 мг/кг PI-3008-AB или PI-0002-AB (изотип), а опухоли и селезенки отбирали через 4 дня после лечения в 10% формалин для ИГХ окрашивания антителом к MARCO мыши, антителом к CD8 и антителом к гранзиму В. Программное обеспечение для анализа изображений HALO (Indica Labs) использовали для количественного определения процентного содержания CD8+ Т-клеток и гранзим В+ клеток по всей площади опухоли. Селезенки окрашивали ИГХ-совместимым отличным от PI-3008 конкурирующим антителом к MARCO мыши.

[0310] Результаты

[0311] Антитело к MARCO PI-3008 индуцировало увеличение количества CD8+ Т-клеток и маркера цитотоксичности гранзима В в опухолях по сравнению с опухолями

животных, получавших изотипический контроль (**Фиг. 49**). Данные представлены в виде средних процентных значений от 3 мышей в каждой группе лечения \pm стандартная ошибка среднего (СОС).

[0312] В селезенке наблюдали изменения уровней MARCO на макрофагах маргинальной зоны с заметными промежутками в области маргинальной зоны (**Фиг. 50**). Для селезенок контрольной группы показано несколько слоев MARCO+ окрашенных клеток, в маргинальной зоне. Слои продолжают вокруг большей части периаартериолярной лимфоидной муфты (PALS) и крышечек В-клеток фолликулов. Селезенки мышей, получавших PI-3008, продемонстрировали гораздо меньшее MARCO+ окрашивание, включая меньше клеток и слоев. Также были промежутки в покрытии PALS и крышечек В-клеток. Так, у животных, получавших PI-3008, наблюдалось снижение MARCO-положительных клеток в маргинальной зоне селезенки. Не желая быть связанными теорией, эти данные позволяют предположить, что антитело к MARCO индуцирует провоспалительную активацию в ТМЕ и приводит к изменениям в адгезии и подвижности, наблюдаемым в селезенке.

Пример 13: Иммуногистохимический анализ MARCO

[0313] Для определения подходящего антитела к MARCO человека для ИГХ для профилирования экспрессии MARCO в фиксированных формалином и заключенных в парафин человеческих тканях было отобрано 15 коммерческих и внутренних антител. Первичный скрининг включал окрашивание фиксированных формалином и заключенных в парафин сверхэкспрессирующих MARCO клеток (CL3010), клеток с экспрессией эндогенного MARCO (L1236) и клеток отрицательного контроля (клетки HEK-293T и клетки Jurkat, которые не экспрессируют MARCO). Антитела, прошедшие первичный скрининг, были включены во вторичный скрининг, в котором фиксированные формалином и заключенные в парафин срезы рака легкого и рака толстой кишки, идентифицированные как имеющие высокую экспрессию РНК с помощью гибридизации *in situ* (ISH), окрашивали в различных условиях ИГХ окрашивания (различные концентрации антител, время инкубации и демаскировка антигенов). Были идентифицированы два потенциальных специфических к человеческому MARCO антител для ИГХ от R&D, RDM5 (клон № 858428.11, кат. CUST017MABP) и RDM9 (клон № 858423.11, кат. CUST017MABP). RDM5 несколько превосходил RDM9 и поэтому был выбран для дальнейшей оптимизации условий ИГХ анализа на дополнительных контрольных тканях. RDM5 продемонстрировал специфическое, сильное и чувствительное мечение MARCO-положительных клеток при использовании в концентрации 2,5 мкг/мл с демаскировкой антигена при высоком pH (ER2) на автоматизированной платформе Leica (**Фиг. 51A**). Окрашивание было подтверждено на микрочипах нормальной и опухолевой ткани (ТМА), а специфичность к MARCO была подтверждена сертифицированным патологоанатомом. Кроме того, экспрессия MARCO в нормальных тканях была ограничена тканевыми макрофагами в легких, печени и селезенке, что подтверждает предыдущие данные по РНК.

[0314] Далее, на 20 тканевых микрочипах (ТМА) из 17 различных патологий опухолевого процесса, содержащих дубликаты биоптатов для каждого субъекта с различными диагнозами (патология, степень злокачественности и стадия по системе TNM) было проведено дополнительное профилирование экспрессии MARCO. ТМА в Reveal Biosciences делали путем получения тканей, которые были зафиксированы в 10% нейтральном буферном формалине в течение 24 часов и обработаны с использованием идентичных СОП. Срезы наносили на предметные стекла Superfrost Plus или Startfrost Adhesive, и все ТМА нарезали в виде свежих серийных срезов толщиной 4 мкм по заказу и хранили при 4°C до ИГХ окрашивания.

[0315] После сканирования всего препарата каждой ТМА при 40-кратном увеличении с использованием сканера Aperio AT2, сертифицированный патологоанатом проводил количественный анализ MARCO+ клеток в строме опухоли, используя следующую систему баллов: 0=<1% положительных клеток, 0,5=1-10% положительных клеток, 1=10-25% положительных клеток, 1,5=25-50% положительных клеток, 2=примерно 50% положительных клеток, 2,5=50-75% положительных клеток, 3=примерно 75% положительных клеток, и 3,5=>75% положительных клеток в строме. Утеранные или свернутые биоптаты, площадь которых была искажена более чем наполовину, исключались из анализа и не учитывались. Окрашивание для каждого пациента считалось положительным, если экспрессия MARCO+ клеток составляла 1% или более 1% в строме. Каждая точка представляет один случай, а медиана для каждой патологии изображается в виде линии

[0316] Процент положительных случаев с пороговым значением на уровне 1% MARCO+ клеток в строме был самым высоким при раке толстой кишки (92%), за ним следовал рак легкого (87%), рак эндометрия (78%), мезотелиома (64%), рак яичников (61%), лимфома (60%), рак щитовидной железы (60%), ТНРМЖ (53%), рак молочной железы (51%), рак головы и шеи (45%), рак желудка (44%), рак поджелудочной железы (43%), рак печени (39%) и рак почки (33%) (**Фиг. 51В**). Самый высокий медианный балл ИГХ для MARCO составлял 1 при раке толстой кишки, легкого, щитовидной железы и мезотелиоме, затем медианный балл составлял 0,75 в лимфоме и раке эндометрия для всех классов опухолей (данные не показаны). Если рассматривать только опухоли поздней III степени злокачественности, медианный балл ИГХ MARCO увеличился с 0,5 до 1 при раке молочной железы и с 0 до 0,5 при раке почки, что указывает на то, что повышенная экспрессия MARCO коррелирует с более высокой степенью злокачественности при этих патологиях опухолевого процесса (**Фиг. 51С**). Кроме того, балл ИГХ MARCO в нормальных тканях была самым высоким в нормальной ткани печени, легких, селезенки, толстой кишки, яичников и нервной ткани, что подтверждает ранее описанные данные по экспрессии РНК MARCO. Таким образом, на основе ИГХ оценки MARCO с использованием антитела RDM5, рак толстой кишки, рак легкого, мезотелиома, лимфома, рак щитовидной железы, рак эндометрия и рак яичников имеют самые высокие баллы ИГХ и количество MARCO-положительных случаев.

Пример 14: Разработка линии клеток для продукции антител к MARCO

[0317] Для каждого вектора с двумя генами проводили две независимые трансфекции с тремя статическими 96-луночными планшетами на трансфекцию. Проводится перенос в суспензионную культуру в 96-луночных планшетах, затем из лучших культур формируются четыре трансфекционного пула. Все культуры сохраняли жизнеспособность $\geq 97\%$ в течение 6 дней культивирования.

[0318] Оценку качества продукта трансфекционного пула проводили после частичной очистки (т.е. аффинной хроматографии MabSelect™ SuRe™ и нейтрализации образца до pH 7). Компания Lonza провела оценку качества продукции с помощью высокоразрешающей гель-проникающей хроматографии (ГП-ВЭЖХ), электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) (в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях) и изоэлектрического фокусирования под визуализационным контролем (iCIEF). Данные агрегации для PI-3030.41 были значительно выше по сравнению с другими кандидатами. Результаты анализа трансфекционного пула показаны в **таблицах 31-36** ниже.

[0319] **Таблица 31:** Данные о концентрации трансфекционного пула

Трансфекционный пул	Концентрация после частичной очистки (мг/мл)	Объем после частичной очистки (мкл)	Общее количество (мг)
3010.15 (1)	0,818	650	0,53
3010.15 (2)	0,959	645	0,62
3010.15 (3)	1,372	650	0,89
3010.15 (4)	1,150	750	0,86
3010.25 (1)	1,248	740	0,92
3010.25 (2)	0,936	655	0,61
3010.25 (3)	1,243	590	0,73
3010.25 (4)	1,271	605	0,77
3030.41 (1)	0,972	650	0,63
3030.41 (2)	1,073	655	0,70
3030.41 (3)	1,025	655	0,67
3030.41 (4)	0,871	650	0,57

[0320] **Таблица 32:** Агрегация трансфекционного пула по данным ГП-ВЭЖХ

Трансфекционный пул	Фрагменты (%)	Мономер (%)		Агрегаты (%)	
3010.15 (1)	< 0,10	89,98	90,0-92,1	10,02	7,9-10,0
3010.15 (2)	< 0,10	91,52		8,48	

3010.15 (3)	< 0,10	92,06		7,94	
3010.15 (4)	< 0,10	91,63		8,37	
3010.25 (1)	< 0,10	95,15	90,2-95,2	4,85	4,9-9,8
3010.25 (2)	< 0,10	90,20		9,80	
3010.25 (3)	< 0,10	94,47		5,53	
3010.25 (4)	< 0,10	92,49		7,51	
3030.41 (1)	< 0,10	80,83	80,3-82,5	19,17	17,5-19,7
3030.41 (2)	< 0,10	81,69		18,31	
3030.41 (3)	< 0,10	82,46		17,54	
3030.41 (4)	< 0,10	80,33		19,67	

[0321] **Таблица 33:** Данные электрофореза трансфекционного пула в присутствии додецилсульфата натрия (в невозстанавливающих условиях)

Трансфекционный пул	Размер LC (кДа)		Чистота LC (%)		Размер HC (кДа)		Чистота HC (%)		Чистота LC+HC (%)	
3010.15 (1)	27,36		42,11		62,47		57,66		99,77	
3010.15 (2)	27,27	27,3-	43,33	41,8-	62,24	62,2-	56,42	56,4-	99,75	99,8
3010.15 (3)	27,61	27,6	41,77	43,3	62,82	62,8	58,02	58,0	99,80	
3010.15 (4)*	27,52		36,73		62,61		57,55		94,27	
3010.25 (1)*	27,02		26,93		63,01		32,45		59,38	
3010.25 (2)	26,70	26,5-	41,47	39,8-	62,09	61,5-	58,13	58,1-	99,60	99,6- 99,7
3010.25 (3)	26,48	27,0	40,72	41,5	61,48	63,0	58,95	59,9	99,67	
3010.25 (4)	26,59		39,77		61,55		59,89		99,65	
3030.41 (1)	26,51		43,32		61,65		56,47		99,79	
3030.41 (2)	26,48	26,5-	43,53	42,5-	61,78	61,7-	56,27	56,0-	99,80	98,7- 99,8
3030.41 (3)	26,72	26,8	42,71	43,5	62,24	62,2	56,01	57,3	98,72	
3030.41 (4)	26,75		42,49		62,21		57,30		99,79	

[0322] * Разница в значениях может быть связана с неполностью восстановленными образцами (что подтверждается электрофореграммой восстановленного образца и данными для невозстановленного образца). Небольшое количество соединений с более высокой молекулярной массой для 3010.15 (4) и значительное количество соединений с более высокой молекулярной массой для 3010.25 (1). Эти значения были исключены из диапазонов чистоты для каждого кандидата.

[0323] **Таблица 34:** Данные электрофореза трансфекционного пула в присутствии додецилсульфата натрия (в невозстанавливающих условиях)

Трансфекционный пул	Размер IgG (кДа)	Чистота IgG (%)
---------------------	------------------	-----------------

3010.15 (1)	170,16	167,8-170,2	96,04	95,8-97,0
3010.15 (2)	169,62		95,83	
3010.15 (3)	167,81		96,67	
3010.15 (4)	168,09		96,99	
3010.25 (1)	168,83	167,7-169,2	96,72	95,7-96,7
3010.25 (2)	168,47		96,53	
3010.25 (3)	169,19		96,43	
3010.25 (4)	167,72		95,70	
3030.41 (1)	165,78	165,0-167,5	96,04	95,2-96,0
3030.41 (2)	164,99		95,59	
3030.41 (3)	167,45		95,90	
3030.41 (4)	166,61		95,24	

[1000] **Таблица 35:** Данные об изоформах белков трансфекционного пула, полученные с помощью iCIEF

Трансфе кционны й пул	Площадь пика (%) *									
	Пики кислых вариантов				Главный пик		Пики основных вариантов			
	Изоформа 5		Изоформа 4		Изоформа 3		Изоформа 2		Изоформа 1	
3010.15 (1)	5,7		18,4		67,7		6,8		< ПКО	
3010.15 (2)	5,3	< ПКО	17,3	17-20	69,2	67-71	6,9	6-7	< ПКО	< ПКО
3010.15 (3)	5,1	- 6	20,1		67,4		6,4		< ПКО	
3010.15 (4)	< ПКО		19,2		70,6		5,8		< ПКО	
3010.25 (1)	< ПКО		15,9		72,8		6,6		< ПКО	
3010.25 (2)	< ПКО	< ПКО	15,9	15-16	72,3	72-73	6,8	7	< ПКО	< ПКО
3010.25 (3)	< ПКО		15,4		72,9		6,7		< ПКО	
3010.25 (4)	< ПКО		16,2		71,9		6,7		< ПКО	

3030.41 (1)	5,4	5-7	19,4	19-21	69,5	68-70	< ПКО	< ПКО - 5	< ПКО	< ПКО
3030.41 (2)	7,0		20,0		67,8		< ПКО		< ПКО	
3030.41 (3)	5,8		20,5		68,9		< ПКО		< ПКО	
3030.41 (4)	6,5		20,2		67,6		5,0		< ПКО	

[1001] * ПКО составляет 4,9%.

[1002] 3010.15: расчетная pI: 9,1; изоформа 5: pI от 8,87 до 8,89; изоформа 4: pI 8,96; изоформа 3: pI от 9,04 до 9,05; изоформа 2: pI от 9,15 до 9,16; изоформа 1: pI от 9,24 до 9,25.

[1003] 3010.25: расчетная pI: 8,8; изоформа 5: pI от 8,30 до 8,31; изоформа 4: pI от 8,46 до 8,47; изоформа 3: pI от 8,61 до 8,62; изоформа 2: pI 8,75; изоформа 1: pI 8,90.

[1004] 3030.41: расчетная pI: 9,1; изоформа 5: pI от 8,80 до 8,82; изоформа 4: pI 8,89; изоформа 3: pI от 8,99 до 9,00; изоформа 2: pI от 9,10 до 9,11; изоформа 1: pI 9,20.

[1005] **Таблица 36:** Обобщенные данные для белков трансфекционного пула, полученные с помощью iCIEF

Трансфекционный пул	Площадь пика (%)					
	Пики кислых вариантов		Главный пик		Пики основных вариантов	
3010.15 (1)	24,1	23-25	67,7	67-71	8,2	7-8
3010.15 (2)	22,6		69,2		8,2	
3010.15 (3)	25,2		67,4		7,5	
3010.15 (4)	22,6		70,6		6,8	
3010.25 (1)	19,8	20-21	72,8	72-73	7,4	7-8
3010.25 (2)	20,0		72,3		7,7	
3010.25 (3)	19,6		72,9		7,4	
3010.25 (4)	20,6		71,9		7,5	
3030.41 (1)	24,8	25-27	69,5	68-70	5,7	5-6
3030.41 (2)	27,0		67,8		5,2	
3030.41 (3)	26,3		68,9		4,8	
3030.41 (4)	26,7		67,6		5,7	

[1006] Трансфекционный пул для 3 антител тестировали на связывание с помощью ИФА и проточной цитометрии на трансфицированных MARCO клетках. Связывание материала пула сравнивали с эталонными антителами, полученными путем транзientной

трансфекции в клетках CHO-S. Антитела, полученные способом стабильной трансфекции, продемонстрировали связывание, сравнимое с эталонными антителами, полученными посредством транзientной трансфекции (**Фиг. 53**).

Пример 15: Анализ растворимого MARCO

[1007] Материалы и способы

[1008] Покрытый стрептавидином планшет MSD (MSD, кат. № L15SA-1) покрывали биотинилированным антителом к MARCO (PI-3041-AB, Pionyr) в концентрации 2 мкг/мл. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин, а затем промывали.

[1009] Белковые стандарты (RG-3000A, Atum) и образцы сыворотки (BioVT) разводили в буфере (PBS/0,5% BSA/0,05% Tween+Ca²⁺/Mg²⁺) и добавляли в планшет с покрытием в разбавителе D43 (MSD, кат. № R50AG-2) с 2 мМ Ca²⁺. Планшет инкубировали 90 мин при комнатной температуре и промывали. Добавляли 1 мкг/мл детектирующего антитела к MARCO (PI-3071-AB, Pionyr) и планшет инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Планшет промывали и в него добавляли 1х буфер для считывания [MSD, кат. № R92TC-1). Планшет считывали на MSD Sector Imager.

[1010] Результаты

[1011] Диапазон результатов количественного анализа sMARCO составлял от 0,1 нг/мл до 100 нг/мл. НПКО составлял 0,1 нг/мл, а ВПКО составлял 100 нг/мл. Калибровочная кривая sMARCO для RG-3000A показана на **Фиг. 55А** и **таблице 37**.

Таблица 37		
Номинальная конц., нг/мл	Обнаруженная средняя конц. (нг/мл)	Среднее значение восстановления, %
100	102,2	102,2
25,0	23,5	94,0
6,25	7,09	113,4
1,56	1,76	113,0
0,39	0,32	83,1
0,10	0,10	100,0

[1012] Уровни sMARCO в нормальных образцах сыворотки крови человека варьировались от 9 нг/мл до 13 нг/мл. Уровни sMARCO в образцах сыворотки крови человека со злокачественным новообразованием варьировались от 6 нг/мл до 22 нг/мл. Уровни sMARCO показаны на **Фиг. 55В**.

[1013] Был успешно разработан иммуноанализ для обнаружения sMARCO в образцах сыворотки крови (человека, яванского макака и мыши). Анализ sMARCO был проверен на специфичность, чувствительность, линейность разведения и селективность и точность определения уровней sMARCO в образцах сыворотки пациентов, полученных из коммерческих источников. Уровни sMARCO были выше у пациентов с диагнозами рака

молочной железы, колоректального рака, мезотелиомы, рака шейки матки, малой лимфоцитарной лимфомы и неходжкинской лимфомы (**Фиг. 55B**).

Пример 16: Исследование мышей с дефицитом В-клеток in vivo

[1014] Способы

[1015] Мыши Balb/c с мутацией J В-клеток были получены от Taconic. Эксперимент на мышах был поставлен, как описано в **Примере 4**. Вкратце, внутривентральное введение дозы начинали, когда средний размер опухолей CT26 достигал $\sim 100 \text{ мм}^3$. Мышам вводили 10 мг/кг антитела PI-3008 или 5 мг/кг антитела к PD-1 по схеме Q5dx4. В качестве контроля использовали мышей ДТ.

[1016] Результаты

[1017] Отсутствие В-клеток снижало эффективность комбинации PI-3008 с антителом к PD1 в опухолях CT26 (**Фиг. 56**). Антитело PI-3008 в комбинации с антителом к PD-1 приводило к большему уменьшению опухоли у мышей дикого типа (верхний ряд) по сравнению с комбинированным лечением у мышей с дефицитом В-клеток, вызванным нокаутом генов, (средний ряд). На нижнем графике представлены объемы опухолей у отдельных мышей для каждого условия.

Пример 17: PI-3010.15 индуцирует сигнальный путь NF-κB

[1018] Материалы и способы

[1019] Клетки THP1-Blue™ NF-κB получали от Invivogen и культивировали в среде RPMI 1640 (Gibco) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco), 25 мМ HEPES (Gibco), 1x GlutaMax (Gibco), 100 мкг/мл нормоцина (Gibco), 10 мкг/мл бластицидина (ThermoFisher). Приблизительно 50000 клеток трансдуцировали лентивирусом, содержащим полноразмерную конструкцию MARCO (CL#3010) при MOI 10 в 500 мкл среды, содержащей 8 мкг/мл полибрена на лунку 24-луночного планшета. После инкубации в течение ночи при 37°C с 5% CO₂ клетки промывали в PBS и высевали в 6-луночный планшет в полную ростовую среду. Через 2-3 дня среду заменяли ростовой средой, содержащей 0,3 мкг/мл пуромидина (Invitrogen) для отбора стабильных клеток, а объединенные клетки культивировали и размножали

[1020] Для репортерного анализа 300000 клеток высевали на лунку 96-луночного планшета с U-образным дном и совместно инкубировали с титрованием дозы PI-3010.15 или контрольного изотипического антитела и 10e6/мл НКLM (Invivogen) или 10 нг/мл FALSTup (Invivogen) и инкубировали в течение 4 часов или в течение ночи при 37°C с 5% CO₂. После инкубации 20 мкл супернатанта переносили в новый 96-луночный планшет и инкубировали со 180 мкл/лунка раствора QuantiBlue (Invivogen) в течение 30-60 минут при 37°C с 5% CO₂. Активность щелочной фосфатазы рассчитывали, измеряя оптическую плотность (ОП) при 650 нм с помощью микропланшетного ридера Tecan.

[1021] Клетки THP-1 со сверхэкспрессией MARCO также использовали для проверки биомаркерной сигнатуры провоспалительных генов, активированных после обработки PI-3010.15. 1×10^6 клеток в 1 мл среды высевали на лунку в 24-луночный планшет. К клеткам добавляли PI-3010.15 и PI-0003 (соответствующий изотип hIgG1) в

концентрации 1 мкг/мл, 5 мкг/мл и 10 мкг/мл на 4 часа и 24 часа. Клетки лизировали буфером RLT и экстрагировали РНК для тестирования путем количественной ПЦР с использованием «человеческих» праймеров для измерения экспрессии TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-10, CCL24, CXCL8, IL-1 α , IL-18 и CCL20.

[1022] **Результаты**

[1023] PI-3010.15 индуцировало сигнальный путь NF- κ B через 4 часа при добавлении HKLM, FSL-1 и FLA-ST UP через 24 часа. PI-3010.15 также индуцировало путь NF- κ B в необработанных клетках через 24 часа (**Фиг. 57**).

[1024] Клетки THP-1 OVX также использовали в качестве заменителя первичных клеток hMDM для тестирования активации провоспалительных цитокинов антителом к MARCO PI-3010.15. Клетки инкубировали с PI-3010.15 или изотипическим антителом в концентрации 1 мкг/мл, 5 мкг/мл или 10 мкг/мл (только TNF α) в течение 4 часов или 24 часов. Клетки собирали и оценивали на экспрессию генов TNF α , IL-6, IL-1 β , CXCL8, CCL20, CCL24 и IL-18 с помощью кПЦР в реальном времени. PI-3010.15 индуцировало экспрессию гена TNF α через 4 часа и 24 часа при всех протестированных концентрациях антител (**Фиг. 71**). PI-3010.15 также индуцировало экспрессию провоспалительных цитокинов IL-6, IL1 β и CXCL8 через 4 часа и 24 часа (**Фиг. 71**). Доза PI-3010.15 в 5 мкг/мл также индуцировала провоспалительные цитокины, такие как CCL20, CCL24 и IL18, через 24 часа (**Фиг. 71**).

Пример 18: Микроматричный анализ фосфорилирования hMDM

[1025] **Способы**

[1026] Микроматричный анализ фосфорилирования проводили с использованием микроматриц антител Full Moon Biosystems Phospho Explorer на первичных человеческих моноцитарных макрофагах (hMDM), поляризованных с помощью IL10 (2 донора).

[1027] Две пробирки замороженных CD14⁺ моноцитов периферической крови человека, выделенных из мононуклеарных клеток периферической крови с помощью негативной иммуномагнитной селекции (StemCell Technologies), размораживали и культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% (об./об.) термоинактивированной FBS (HyClone), 1 mM пирувата натрия, заменимых аминокислот, 2 mM L-глутамина, 55 мкМ 2-меркаптоэтанол и противогрибкового раствора с антибиотиком (все от Gibco). Моноциты дифференцировали в макрофаги путем культивирования в полной среде RPMI 1640 в присутствии 50 нг/мл колониестимулирующего фактора макрофагов человека (M-CSF) (PeproTech) при плотности 500000 клеток на лунку в 24-луночных планшетах. На 3-й день дифференцировки в среду добавляли свежий M-CSF. Дифференцированные макрофаги человека поляризовали на 6-й день добавлением 25 нг/мл рекомбинантного человеческого IL-10 (состояние M2) на 24 часа при 37°C. На 7-й день среду аспирировали и осторожно промывали клетки. В лунки с 5 мкг/мл изотипического контроля PI-3010.15 или hIgG1 (PI-0003) добавляли 500 мкл инкубационной среды (1xRPMI с 0,5% BSA). Обработку прекращали через 5 и 15 минут промыванием ледяным PBS и лизисом клеток 300 мкл mPer и 1:100 ингибиторов протеаз HALT и фосфатазы. Приблизительно 300 мкг

белкового лизата было отправлено в Full Moon Biosystems для создания микроматрицы антител Phospho Explorer. Компания Full Moon Biosystems использовала свой стандартный протокол для мечения, конъюгации и определения средней интенсивности сигнала повторяющихся точек для каждой пары сайт-специфических антител и специфических к сайту фосфорилирования антител, а также для определения отношения сигналов парных антител. Изменения кратности между контролем и контрольными образцами рассчитывали по следующей формуле: обработанный образец/контрольный образец (обработанный или необработанный hIgG1).

[1028] Идентифицированные фосфорилированные белки считались значимыми, если кратность изменения была меньше 0,6 или больше 1,8 для анализа соотношения PI-3010.15/изотип и PI-3010.15/без обработки. Кроме того, было включено несколько идентифицированных белков, если изотип сам по себе оказывал существенное влияние по сравнению с необработанными из-за изменений опосредованного Fc сигналинга в hMDM (менее чем 0,75-кратное снижение или более чем 1,5-кратное увеличение по сравнению с необработанными). Для этих идентифицированных белков соотношение PI-3010.15/необработанный считалось значимым при уменьшении менее 0,75 раза и увеличении более 1,5 раза, если отношение PI-3010.15/изотип находилось в значимом диапазоне (<0,6 и выше 1,8 раза).

[1029] Результаты

[1030] В таблице 38 показано значимое фосфорилирование в клетках, обработанных PI-3010.15 относительно обработанных изотипом, и клеток, обработанных PI-3010.15, относительно необработанных клеток (UT), через 5 минут.

Таблица 38		
Повышение (>1,8 FC)		
Ген	3015 и Изотип (5 минут)	3015 и UT (5 минут)
Циклин B1 (фосфо-Ser147)	5,084445769	2,561147785
IRS-1 (фосфо-Ser794)	4,447939568	2,871815775
PDGFR-альфа (фосфо-Tyr849)	3,247023728	2,0112109
Elk1 (фосфо-Ser389)	2,650795969	1,93843226
HSP27 (фосфо-Ser78)	2,618765237	2,781365032
CDK1/CDC2 (фосфо-Tyr15)	2,495918288	2,915628441
CDK5 (фосфо-Tyr15)	2,495088042	3,772464066
IL-2RA/CD25 (фосфо-Ser268)	2,385317047	2,26149298
Raf1 (фосфо-Ser259)	2,345569464	2,986531327
GluR1 (фосфо-Ser863)	2,218294441	2,416141632
LYN (фосфо-Tyr507) - путь Src	2,16499766	1,97114872

Эзрин (фосфо-Thr566)	2,148744088	2,992168753
Ламин А/С (фосфо-Ser392)	2,141294348	2,948772441
ВAD (фосфо-Ser91/128)	2,011033931	2,461349555
Тау-белок (фосфо-Ser396)	1,955441551	1,918036855
MAP3K8/COT (фосфо-Thr290)	1,943373784	1,967650786
HDAC5 (фосфо-Ser259)	1,922487843	2,088809947
PAK3 (фосфо-Ser154)	1,910328132	2,017578127
mTOR (фосфо-Thr2446)	1,8	2,42
Снижение (<0,6 FC)		
14-3-3 бета/дзета (фосфо-Ser186/184)	0,528463565	0,574004751
Синапсин (Phospho-Ser9)	0,468698508	0,444984245
PKC-дельта (фосфо-Ser645)	0,452312753	0,359573251
14-3-3 дзета (фосфо-Ser58)	0,446714092	0,3453927
Abl1 (фосфо-Thr754/735)	0,399803417	0,334055031
AKT1 (фосфо-Ser246)	0,38984194	0,479793736
Smad1 (фосфо-Ser187)	0,380264132	0,442638779

[1031] В таблице 39 приведены дополнительные идентифицированные белки для образцов через 5 минут, которые не попали в первый фильтр.

Таблица 39			
Ген	3015 и Изотип	3015 и Без обработки	Изотип и Без обработки
ATF2 (фосфо-Ser62/44)	2,13	1,59	0,75
Клаудин 3 (фосфо-Tyr219)	0,22	0,68	3,04
Коннексин 43 (фосфо-Ser367)	0,29	0,67	2,32
LCK (фосфо-Tyr192)	0,30	0,63	2,06
Src (фосфо-Tyr529)	0,32	0,78	2,45
ИКК-бета (фосфо-Tyr188)	0,42	0,77	1,84
PLD1 (фосфо-Ser561)	0,42	0,78	1,86

[1032] В таблице 40 приведены дополнительные идентифицированные белки для образцов через 5 минут, где изотип снижал сигнал (менее чем в 0,6 раза по сравнению с необработанными), а PI-3010.15 сохраняло эффект с биологической значимостью. Кратность увеличения по сравнению с PI-3010.15/необработанными может составлять >0,9.

Таблица 40			
Ген	3015 и	3015 и	Изотип и

	Изотип	Без обработки	Без обработки
CaMK1-альфа (фосфо-Thr177)	4,58	1,13	0,25
p27Kip1 (фосфо-Thr187)	3,35	0,95	0,28
Кортактин (фосфо-Tyr421)	3,00	1,29	0,43
Кератин 18 (фосфо-Ser52)	2,36	0,96	0,41
ФАК (фосфо-Tyr397)	2,19	0,88	0,40
IkB-бета (фосфо-Thr19)	2,13	1,10	0,52
PLC бета3 (фосфо-Ser1105)	2,11	1,10	0,52

[1033] В таблице 41 показано значимое фосфорилирование в клетках, обработанных PI-3010.15 относительно обработанных изотипом, и клеток, обработанных PI-3010.15, относительно необработанных клеток (UT), через 15 минут.

Таблица 41		
Повышение (>1,8 FC)		
Ген	Ген	Ген
SYK (фосфо-Tyr525)	3,763491432	2,629401334
Dok-1 (фосфо-Tyr398)	3,086467586	2,609649844
IKK-альфа/бета (фосфо-Ser180/181)	2,959202923	1,934873037
HSP90B (фосфо-Ser226)	2,870020923	3,546965968
GluR1 (фосфо-Ser863)	2,609270653	2,21995696
Синаптоагмин (фосфо-Ser309)	2,600941915	2,136658796
SHP-2 (фосфо-Tyr580)	2,597416517	2,242046774
Филамин А (фосфо-Ser2152)	2,335627516	1,996061335
CaMK4 (фосфо-Thr196/200)	2,279954736	1,893568987
Синуклеин-альфа (фосфо-Tyr133)	2,131004882	1,874499543
HDAC5 (фосфо-Ser498)	2,110924432	2,744099757
P70S6K (фосфо-Ser424)	2,076974184	1,870856295
4E-BP1 (фосфо-Ser65)	2,06037659	2,827767866
Кальмодулин (фосфо-Thr79/Ser81)	2,046380319	2,662693319
МКК4/SEK1 (фосфо-Thr261)	2,035499973	3,040392853
IL-2RA/CD25 (фосфо-Ser268)	1,973584034	2,080305927
Синаптоагмин (фосфо-Thr202)	1,930362488	1,991073071
Rb (фосфо-Ser780)	1,874035219	1,974833058
Тирозингидроксилаза (фосфо-Ser40)	1,852127179	1,934979677
Снижение (> 0,6 FC)		

PLCG2 (фосфо-Tyr1217)	0,591517857	0,563418522
Kv1.3/KCNA3 (фосфо-Tyr135)	0,57141834	0,586825891
DARPP-32 (фосфо-Thr34)	0,55741993	0,41127774
Клаудин 7 (фосфо-Tyr210)	0,556173961	0,597139861
Rel (фосфо-Ser503)	0,554992754	0,509612791
Эзрин (фосфо-Tyr478)	0,535586574	0,508394478
LKB1 (фосфо-Ser428)	0,531130409	0,520111023
AurA (фосфо-Ser342)	0,527800917	0,49832997
p130Cas (фосфо-Tyr165)	0,519493014	0,521059511
Кортактин (фосфо-Tyr421)	0,474466269	0,464638242
Dok-1 (фосфо-Tyr362)	0,456406193	0,482008648
Кератин 18 (фосфо-Ser33)	0,417597114	0,288197731
CaMK2-бета/гамма/дельта (фосфо-Thr287)	0,410587574	0,537483464
ЕТК (фосфо-Tyr40)	0,409259434	0,437316317
NFkB-p65 (фосфо-Thr435)	0,400460795	0,344387917
p27Kip1 (фосфо-Ser10)	0,383076583	0,540101088
NFkB-p100/p52 (фосфо-Ser869)	0,37145326	0,532229421
VEGFR2 (фосфо-Tyr1175)	0,368651283	0,39699714
PKC-дельта (фосфо-Ser645)	0,3449432	0,538228023
Эстрогеновый рецептор-альфа (фосфо-Ser118)	0,322713977	0,305382748
HSL (фосфо-Ser554)	0,31391716	0,411180773
CD3Z (фосфо-Tyr142)	0,309319341	0,377863121
PAK3 (фосфо-Ser154)	0,288315803	0,472978229
Raf1 (фосфо-Ser296)	0,241201384	0,310819568
CDK1/CDC2 (фосфо-Thr14)	0,232456135	0,311120574

[1034] В таблице 42 представлены дополнительные идентифицированные белки, которые оказались за пределами первого фильтра для образцов чере 15 минут.

Таблица 42			
Ген	3015 и Изотип	3015 и Без обработки	Изотип и Без обработки
PKC-эпсилон (фосфо-Ser729)	0,34	0,75	2,19
EGFR (фосфо-Tyr1110)	0,41	0,71	1,71
ASK1 (фосфо-Ser966)	0,42	0,67	1,58
c-Jun (фосфо-Ser63)	0,43	0,76	1,78

TOP2A/ДНК-топоизомераза II (фосфо-Ser1106)	0,45	0,77	1,72
STAT6 (фосфо-Thr645)	0,48	0,74	1,53

[1035] Основываясь на скрининге с помощью микроматричного анализа фосфорилирования, через 5 минут подавлялись следующие пути: клеточная адгезия: клаудин 3, коннексин 43, синапсин; 14-3-3 бета и дзета: адаптор, который модулирует множество пути инфламмасом; путь мастер-регулятора PI3K: AKT1; PKC-дельта (выше от Src); сигналинг TGFb: Smad1; сигналинг c-Abl (модулирует сигналинг STAT); и путь Src: LCK, Src (цитоскелетная перестройка, фагоцитоз и выживание).

[1036] Активированные пути через 5 минут включали: клеточный цикл: циклин B1, CDK1/CDC2, CDK5, PAK3; IRS-1: рецептор инсулина, активируемый инсулином и IL-4, который находится выше от AKT; PDGFR: рецептор тромбоцитарного фактора активирует Ras/ERK для регуляции ангиогенеза, пролиферации, миграции генов; ELK1: фактор транскрипции, который находится ниже от ERK/PDGFR и Rac/JNK во время инфламмасом; Raf1: активируется ЛПС или mCSF и находится выше от активации ERK1/2 для пролиферации и активации; LYN: активируется LDL на CD36 и BCR и, среди прочего, фосфорилирует AKT и SYK (метаболическое перепрограммирование); IL-2RA/CD25: активирует сигналинг JAK/STAT, PI3K и Ras; ламин A/C, эзрин, PAK3 (эффекторы PAK группы 1, которые находятся ниже от Ras-родственной Rho ГТФазы Cdc42 и Rac и AKT), перестройку цитоскелета; MAPK38 (TPL2): (MAP3 K) активируется ниже от TNF α R, IL1R, TLR, CD40, IL17R. TPL2 регулирует пути MEK1/2 и ERK1/2, чтобы регулировать каскад воспалительных реакций; BAD: выживание, ниже от AKT; и модификация хроматина: HDAC5.

[1037] Пути, которые активировались через 15 минут, были следующими: регуляция: кальмодулин, GLUR1, HSP90; индукция ферментативной активности: SYK, GLUR1, SHP-2, MKK4, CAMK4; молекулярная ассоциация: DOK1, GLUR1, SHP-2, HSP90; подвижность клеток и реорганизация цитоскелета: филламин А, IKKa/b, SHP-2; активация транскрипции: IKKa/b, CAMK4, MKK4; активация рецептора IL2; mTOR и модификация трансляции: P70S6K, 4E-BP1; и кальциевый сигналинг, эндоцитоз, экзоцитоз, синапсы, микротрубочки: синаптогамин, CAMK4, синуклеин-альфа.

[1038] Пути, которые подавлялись через 15 минут, были следующими: регуляция (выживание): Raf1, VEGFR2, PKC-дельта, EGFR, STAT6; молекулярная ассоциация: DOK1, GLUR1, SHP-2, HSP90; подвижность клеток и реорганизация цитоскелета: клаудин 7, кортактин, PKC-дельта, p130Cas, эзрин, PAK3; регуляция пути Nfkb: Nfkb p100, Rel, Nfkb-p65; прогрессирование клеточного цикла: CDK1, p27Kip1, AurA, PKC, CAMK2; кальциевый сигналинг: PKC, CaMK2; сигналинг TCR: CD3z, который находится ниже сигналинга LCK и выше ZAP70.

[1039] Хотя изобретение было конкретно показано и описано со ссылкой на предпочтительный вариант осуществления и различные альтернативные варианты

осуществления, специалистам в соответствующей области техники будет понятно, что в него могут быть внесены различные изменения в форме и деталях без отступления от сущности и объема изобретения.

[1040] Все ссылки, выданные патенты и заявки на патенты, цитируемые в тексте данного описания, включены в данный документ посредством ссылки во полном объеме для всех целей.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO	Название	Последовательность
1	Вариабельный домен тяжелой цепи HX-3031	QVQLKESGPGGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWMGAIWTGGSIAYNLLKSRLSISRDTSKSQVFL KMNSLQTEDTATYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGVMV TVST
2	CDR-H1 HX-3031	GFSLTSYHVS
3	CDR-H2 HX-3031	AIWTGGSIA
4	CDR-H3 HX-3031	DLSDYYSSYTSFDY
5	Тяжелая цепь HX-3031	QVQLKESGPGGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWMGAIWTGGSIAYNLLKSRLSISRDTSKSQVFL KMNSLQTEDTATYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGVMV TVSTAETTAPSVYPLAPGTALKSNSMVTLGCLVKGYPPEP VTVTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWS SQA VTCNVAHPASSTKVDKKIVPRECNPCGCTGSEVSSVF IFPPKTKDVLITLTPKVTCVVVDISQNDPEVRFSWFIDDV EVHTAQTHAPEKQSNSTLRSVSELPIVHRDWLNGKTFKCK VNSGAFPAPIEKSSISKPEGTPRGPQVYTMAPPKEEMTQSQ VSITCMVKGFPDIYTEWKMNGQPQENYKNTPTMDTD GSYFLYSKLNKVKETWQQGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKS LSHSP*
6	Вариабельный домен легкой цепи HX-3031	DIQMTQSPASLSTSLGETVSI ECLASEGISNDLAWYQQKSG KSPQLLIYAASRLQDGVPSRFGSGSGTRYSLKISGMQPED EADYFCQQSYKYPLTFGSGTKLEIK
7	CDR-L1 HX-	LASEGISNDLA

	3031	
8	CDR-L2 HX- 3031	AASRLQD
9	CDR-L3 HX- 3031	QQSYKYPLT
10	Легкая цепь HX-3031	DIQMTQSPASLSTSLGETVSIIECLASEGISNDLAWYQQKSG KSPQLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRYSLKISGMQPED EADYFCQQSYKYPLTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSTE QLATGGASVVCLMNNFYPRDISVKWKIDGTERRDGVLD VTDQDSKDYSTYSMSSTLSLTKADYESHNLTYTCEVVHKTSS SPVVKSFNRNEC*
11	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3010- AB	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWMGAIWTGGSIAYNLLKSRLSISRDTSKSQVFL KMNSLQTEDTATYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGMV TVST
12	CDR-H1 PI- 3010-AB	GFSLTSYHVS
13	CDR-H2 PI- 3010-AB	AIWTGGSIA
14	CDR-H3 PI- 3010-AB	DLSDYYSSYTSFDY
15	Тяжелая цепь PI-3010-AB	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWMGAIWTGGSIAYNLLKSRLSISRDTSKSQVFL KMNSLQTEDTATYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGMV TVSTASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*
16	Вариабельный	DIQMTQSPASLSTSLGETVSIIECLASEGISNDLAWYQQKSG

	домен легкой цепи PI-3010- AB	KSPQLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRYSLKISGMQPED EADYFCQQSYKYPLTFGSGTKLEIK
17	CDR-L1 PI- 3010-AB	LASEGISNDLA
18	CDR-L2 PI- 3010-AB	AASRLQD
19	CDR-L3 PI- 3010-AB	QQSYKYPLT
20	Легкая цепь PI- 3010-AB	DIQMTQSPASLSTSLGETVSI ECLASEGISNDLAWYQQKSG KSPQLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRYSLKISGMQPED EADYFCQQSYKYPLTFGSGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC*
21	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3011- AB	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGFSLTSYHVS WIRQPP GKGLEWIGAIWTGGSIA YNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLVTVS S
22	CDR-H1 PI- 3011-AB	GFSLSYHVS
23	CDR-H2 PI- 3011-AB	AIWTGGSIA
24	CDR-H3 PI- 3011-AB	DLSDYYSSYTSFDY
25	Тяжелая цепь PI-3011-AB	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGFSLTSYHVS WIRQPP GKGLEWIGAIWTGGSIA YNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR

		DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK*
26	Вариабельный домен легкой цепи PI-3011- AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSYKYPLTFGQGTKLEIK
27	CDR-L1 PI- 3011-AB	RASEGISNDLA
28	CDR-L2 PI- 3011-AB	AASRLQD
29	CDR-L3 PI- 3011-AB	QQSYKYPLT
30	Легкая цепь PI- 3011-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSYKYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC*
31	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3012- AB	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLVTV SS
32	CDR-H1 PI- 3012-AB	GFSLTSYHVS
33	CDR-H2 PI- 3012-AB	AIWTGGSIA
34	CDR-H3 PI- 3012-AB	DLSDYYSSYTSFDY
35	Тяжелая цепь PI-3012-AB	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ

		TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK*
36	Вариабельный домен легкой цепи PI-3012- AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCQQSYKYPLTFGQGTKLEIK
37	CDR-L1 PI- 3012-AB	RASEGISNDLA
38	CDR-L2 PI- 3012-AB	AASRLQD
39	CDR-L3 PI- 3012-AB	QQSYKYPLT
40	Легкая цепь PI- 3012-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCQQSYKYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC*
41	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3013- AB	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLVTV SS
42	CDR-H1 PI- 3013-AB	GFSLTSYHVS
43	CDR-H2 PI- 3013-AB	AIWTGGSIA
44	CDR-H3 PI- 3013-AB	DLSDYYSSYTSFDY
45	Тяжелая цепь	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP

	PI-3013-AB	PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYSSYTSFDYWGQGLTVV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK*
46	Вариабельный домен легкой цепи PI-3013- AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPE DFATYYCQQSYKYPLTFGQGTKLEIK
47	CDR-L1 PI- 3013-AB	RASEGISNDLA
48	CDR-L2 PI- 3013-AB	AASRLQD
49	CDR-L3 PI- 3013-AB	QQSYKYPLT
50	Легкая цепь PI- 3013-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPE DFATYYCQQSYKYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC*
51	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3014- AB	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWMGAIWTGGSIAYNPSLKSRLTISRDTSKNQVSL KMSSLTAADTAVYYCARDLSDYSSYTSFDYWGQGLTV TVSS
52	CDR-H1 PI- 3014-AB	GFSLTSYHVS
53	CDR-H2 PI-	AIWTGGSIA

	3014-AB	
54	CDR-H3 PI- 3014-AB	DLSDYYSSYTSFDY
55	Тяжелая цепь PI-3014-AB	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWMGAIWTGGSIAYNPSLKSRLTISRDTSKNQVSL KMSSLTAADTAVYYCARDLSDYSSYTSFDYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*
56	Вариабельный домен легкой цепи PI-3014- AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCQQSYKYPLTFGQGTKLEIK
57	CDR-L1 PI- 3014-AB	RASEGISNDLA
58	CDR-L2 PI- 3014-AB	AASRLQD
59	CDR-L3 PI- 3014-AB	QQSYKYPLT
60	Легкая цепь PI- 3014-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCQQSYKYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC*
61	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3015-	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWMGAIWTGGSIAYNPSLKSRLTISRDTSKNQVSL KMSSLTAADTAVYYCARDLSDYSSYTSFDYWGQGLV

	AB	TVSS
62	CDR-H1 PI- 3015-AB	GFSLTSYHVS
63	CDR-H2 PI- 3015-AB	AIWTGGSIA
64	CDR-H3 PI- 3015-AB	DLSDYYSSYTSFDY
65	Тяжелая цепь PI-3015-AB	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWMGAIWTGGSIAYNPSLKSRLTISRDTSKNQVSL KMSSLTAADTAVYYCARDLSDYSSYTSFDYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*
66	Вариабельный домен легкой цепи PI-3015- AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPE DFATYYCQQSYKYPLTFGQGTKLEIK
67	CDR-L1 PI- 3015-AB	RASEGISNDLA
68	CDR-L2 PI- 3015-AB	AASRLQD
69	CDR-L3 PI- 3015-AB	QQSYKYPLT
70	Легкая цепь PI- 3015-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPE DFATYYCQQSYKYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ

		GLSSPVTKSFNRGEC*
71	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3020- AB	QVQLKESGPGGLVQPSQTLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWMGAIWTGGSIAYNLLKSRLSISRDTSKSQVFL KMNSLQTEDTATYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGVMV TVST
72	CDR-H1 PI- 3020-AB	GFSLTSYHVS
73	CDR-H2 PI- 3020-AB	AIWTGGSIA
74	CDR-H3 PI- 3020-AB	DLSDYYSSYTSFDY
75	Тяжелая цепь PI-3020-AB	QVQLKESGPGGLVQPSQTLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWMGAIWTGGSIAYNLLKSRLSISRDTSKSQVFL KMNSLQTEDTATYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGVMV TVSTASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSLGK*
76	Вариабельный домен легкой цепи PI-3020- AB	DIQMTQSPASLSTSLGETVSIIECLASEGISNDLAWYQQKSG KSPQLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGLTRYSLKISGMQPED EADYFCQQSYKYPLTFGSGTKLEIK
77	CDR-L1 PI- 3020-AB	LASEGISNDLA
78	CDR-L2 PI- 3020-AB	AASRLQD
79	CDR-L3 PI- 3020-AB	QQSYKYPLT
80	Легкая цепь PI-	DIQMTQSPASLSTSLGETVSIIECLASEGISNDLAWYQQKSG

	3020-AB		KSPQLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRYSLKISGMQPED EADYFCQQSYKYPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC*
81	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3022- AB		QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLTVTV SS
82	CDR-H1 PI- 3022-AB		GFSLTSYHVS
83	CDR-H2 PI- 3022-AB		AIWTGGSIA
84	CDR-H3 PI- 3022-AB		DLSDYYSSYTSFDY
85	Тяжелая цепь PI-3022-AB		QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK*
86	Вариабельный домен легкой цепи PI-3022- AB		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCQQSYKYPLTFGQGTKLEIK
87	CDR-L1 PI- 3022-AB		RASEGISNDLA
88	CDR-L2 PI-		AASRLQD

	3022-AB	
89	CDR-L3 PI- 3022-AB	QQSYKYPLT
90	Легкая цепь PI- 3022-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCQQSYKYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC*
91	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3023- AB	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLVTV SS
92	CDR-H1 PI- 3023-AB	GFSLTSYHVS
93	CDR-H2 PI- 3023-AB	AIWTGGSIA
94	CDR-H3 PI- 3023-AB	DLSDYYSSYTSFDY
95	Тяжелая цепь PI-3023-AB	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK*
96	Вариабельный домен легкой цепи PI-3023-	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKSPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPED FATYFCQQSYKYPLTFGQGTKLEIK

	AB	
97	CDR-L1 PI- 3023-AB	RASEGISNDLA
98	CDR-L2 PI- 3023-AB	AASRLQD
99	CDR-L3 PI- 3023-AB	QQSYKYPLT
100	Легкая цепь PI- 3023-AB	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKSPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPED FATYFCQQSYKYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC*
101	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3024- AB	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLTVTV SS
102	CDR-H1 PI- 3024-AB	GFSLTSYHVS
103	CDR-H2 PI- 3024-AB	AIWTGGSIA
104	CDR-H3 PI- 3024-AB	DLSDYYSSYTSFDY
105	Тяжелая цепь PI-3024-AB	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEAL

		HNHYTQKSLSLSPGK*
106	Вариабельный домен легкой цепи PI-3024- AB	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKSPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DEATYFCQQSYKYPLTFGQGTKLEIK
107	CDR-L1 PI- 3024-AB	RASEGISNDLA
108	CDR-L2 PI- 3024-AB	AASRLQD
109	CDR-L3 PI- 3024-AB	QQSYKYPLT
110	Легкая цепь PI- 3024-AB	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKSPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DEATYFCQQSYKYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC*
111	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3025- AB	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLTVTV SS
112	CDR-H1 PI- 3025-AB	GFSLSYHVS
113	CDR-H2 PI- 3025-AB	AIWTGGSIA
114	CDR-H3 PI- 3025-AB	DLSDYYSSYTSFDY
115	Тяжелая цепь PI-3025-AB	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN

		WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK*
116	Вариабельный домен легкой цепи PI-3025- AB	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKSPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DEATYFCQQSYKYPLTFGQGTKLEIK
117	CDR-L1 PI- 3025-AB	RASEGISNDLA
118	CDR-L2 PI- 3025-AB	AASRLQD
119	CDR-L3 PI- 3025-AB	QQSYKYPLT
120	Легкая цепь PI- 3025-AB	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKSPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DEATYFCQQSYKYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC*
121	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3026- AB	VQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPP GKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLTVTV SS
122	CDR-H1 PI- 3026-AB	GFSLTSYHVS
123	CDR-H2 PI- 3026-AB	AIWTGGSIA
124	CDR-H3 PI- 3026-AB	DLSDYYSSYTSFDY
125	Тяжелая цепь PI-3026-AB	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLTVTV

		SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK*
126	Вариабельный домен легкой цепи PI-3026- AB	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKSPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPED FATYFCQQSYKYPLTFGQGTKLEIK
127	CDR-L1 PI- 3026-AB	RASEGISNDLA
128	CDR-L2 PI- 3026-AB	AASRLQD
129	CDR-L3 PI- 3026-AB	QQSYKYPLT
130	Легкая цепь PI- 3026-AB	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKSPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPED FATYFCQQSYKYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC*
131	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3027- AB	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLVTV SS
132	CDR-H1 PI- 3027-AB	GFSLTSYHVS
133	CDR-H2 PI- 3027-AB	AIWTGGSIA
134	CDR-H3 PI-	DLSDYYSSYTSFDY

	3027-AB	
135	Тяжелая цепь PI-3027-AB	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK*
136	Вариабельный домен легкой цепи PI-3027- AB	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKSPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DEATYFCQQSYKYPLTFGQGTKLEIK
137	CDR-L1 PI- 3027-AB	RASEGISNDLA
138	CDR-L2 PI- 3027-AB	AASRLQD
139	CDR-L3 PI- 3027-AB	QQSYKYPLT
140	Легкая цепь PI- 3027-AB	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKSPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DEATYFCQQSYKYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC*
141	Вариабельный домен тяжелой цепи HX-3061	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKLSCVASKFTFSNYGMNWIRQ APKKGLEWIALIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLEMNSLRSEDAMYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGMVMT VSS
142	CDR-H1 HX-	KFTFSNYGMN

	3061	
143	CDR-H2 HX- 3061	LIYYNSNNKY
144	CDR-H3 HX- 3061	SLTGGSDYFDS
145	Тяжелая цепь HX-3061	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKLSVASKFTFSNYGMNWIRQ APKKGLEWIALIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLEMNSLRSEDAMYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGMVMT VSSAETTAPSVYPLAPGTALKSNSMVTLGCLVKGYFPEPV TVTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWPS QTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRNCGGDCKPCICTGSEVS SVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVDISQDDPEVHFSWFV DDVEVHTAQTRPPEEQFNSTFRSVSELPILHQDWLNGRTF RCKVTSAAFPSPIEKTISKPEGRTQVPHVYTMSPTKEEMTQ NEVSITCMVKGFIYPPDIYVEWQMNGQPQENYKNTPTMD TDGSYFLYSKLNKKEKWQQGNTFTCSVLHEGLHNHHTE KSLSHSP*
146	Вариабельный домен легкой цепи HX-3061	DVQMTQSPSYLAASPGESVSISCKASKSIGTFLAWYQEKP EKTNKLIIYSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRNLEPED FAVYYCQQHDEYPFTFGSGTKLEIK
147	CDR-L1 HX- 3061	KASKSIGTFLA
148	CDR-L2 HX- 3061	SGSTLQS
149	CDR-L3 HX- 3061	QQHDEYPFT
150	Легкая цепь HX-3061	DVQMTQSPSYLAASPGESVSISCKASKSIGTFLAWYQEKP EKTNKLIIYSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRNLEPED FAVYYCQQHDEYPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSTE QLATGGASVVCLMNNFYPRDISVKWKIDGTERRDGLDSD VTDQDSKDYSTYSMSSTLSLTKADYESHNLYTCEVVHKTSS SPVVKSFNRENC*
151	Вариабельный домен тяжелой	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASKFTFSNYGMNWVRQ APKKGLEWVSLIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDNKNT

	цепи PI-3016-AB	LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGLV TVSS
152	CDR-H1 PI-3016-AB	KFTFSNYGMN
153	CDR-H2 PI-3016-AB	LIYYNSNNKY
154	CDR-H3 PI-3016-AB	SLTGGSDYFDS
155	Тяжелая цепь PI-3016-AB	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASKFTFSNYGMNWVRQ APGKGLEWVSLIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*
156	Вариабельный домен легкой цепи PI-3016-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIGTFLAWYQQKP GKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHDEYPFTFGQGTKLEIK
157	CDR-L1 PI-3016-AB	RASKSIGTFLA
158	CDR-L2 PI-3016-AB	SGSTLQS
159	CDR-L3 PI-3016-AB	QQHDEYPFT
160	Легкая цепь PI-3016-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIGTFLAWYQQKP GKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHDEYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE

		SVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC*
161	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3017- AB	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASKFTFSNYGMNWIRQ APGKGLEWIALIYYNSNKKYYADSVKGRFTISRDNKNTL YMQMNSLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGLVT VSS
162	CDR-H1 PI- 3017-AB	KFTFSNYGMN
163	CDR-H2 PI- 3017-AB	LIYYNSNKKY
164	CDR-H3 PI- 3017-AB	SLTGGSDYFDS
165	Тяжелая цепь PI-3017-AB	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASKFTFSNYGMNWIRQ APGKGLEWIALIYYNSNKKYYADSVKGRFTISRDNKNTL YMQMNSLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*
166	Вариабельный домен легкой цепи PI-3017- AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIGTFLAWYQQK GKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHDEYPTFGQGTKLEIK
167	CDR-L1 PI- 3017-AB	RASKSIGTFLA
168	CDR-L2 PI- 3017-AB	SGSTLQS
169	CDR-L3 PI- 3017-AB	QQHDEYPT

170	Легкая цепь PI-3017-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIGTFLAWYQQKP GKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHDEYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC*
171	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3018-AB	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMNWIRQ APGKGLEWIALIYYNSNKKYYADSVKGRFTISRDNKNTL YMQMNSLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGTLLVTVSS
172	CDR-H1 PI-3018-AB	KFTFSNYGMN
173	CDR-H2 PI-3018-AB	LIYYNSNKKY
174	CDR-H3 PI-3018-AB	SLTGGSDYFDS
175	Тяжелая цепь PI-3018-AB	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMNWIRQ APGKGLEWIALIYYNSNKKYYADSVKGRFTISRDNKNTL YMQMNSLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGTLLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
176	Вариабельный домен легкой цепи PI-3018-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIGTFLAWYQQKP GKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHDEYPFTFGQGTKLEIK
177	CDR-L1 PI-3018-AB	RASKSIGTFLA

178	CDR-L2 3018-AB	PI-	SGSTLQS
179	CDR-L3 3018-AB	PI-	QQHDEYPFT
180	Легкая цепь 3018-AB	PI-	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIGTFLAWYQQKP GKAPKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHDEYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC*
181	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3019- AB	PI-	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKLSKVASKFTFSNYGMNWIRQ APKKGLEWIALIYYNSNKKYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLEMNSLRSEDAMYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGMVMT VSS
182	CDR-H1 3019-AB	PI-	KFTFSNYGMN
183	CDR-H2 3019-AB	PI-	LIYYNSNKKY
184	CDR-H3 3019-AB	PI-	SLTGGSDYFDS
185	Тяжелая цепь PI-3019-AB		EVQLVESGGGLVQPGSSSLKLSKVASKFTFSNYGMNWIRQ APKKGLEWIALIYYNSNKKYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLEMNSLRSEDAMYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGMVMT VSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPV TLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS QSITCNVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLL GGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSITLRVVSALPIQHQQDWS GKEFKCKVNNKDLPAIERTISKPKGSRAPQVYVLPPEE EMTKKQVTLTCMVTDFTMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT EPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLH NHHTTKSFSRTPGK*
186	Вариабельный домен легкой		DVQMTQSPSYLAASPGESVSIISKASKSIGTFLAWYQEKP EKTNKKLLIYSGSTLQSGTSPSRFSGSGSGTDFTLTIRNLEPED

	цепи PI-3019-AB	FAVYYCQQHDEYPFTFGSGTKLEIK
187	CDR-L1 PI-3019-AB	KASKSIGTFLA
188	CDR-L2 PI-3019-AB	SGSTLQS
189	CDR-L3 PI-3019-AB	QQHDEYPFT
190	Легкая цепь PI-3019-AB	DVQMTQSPSYLAASPGESVVISCKASKSIGTFLAWYQEKPEKTNKLLIYSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRNLEPEDFAVYYCQQHDEYPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS TSPIVKSFNRNEC*
191	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3028-AB	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKLSCVASKFTFSNYGMNWIRQAPKKGLEWIALIYYNSNKKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLEMNSLRSEDAMYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGMVTVSS
192	CDR-H1 PI-3028-AB	KFTFSNYGMN
193	CDR-H2 PI-3028-AB	LIYYNSNKKY
194	CDR-H3 PI-3028-AB	SLTGGSDYFDS
195	Тяжелая цепь PI-3028-AB	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKLSCVASKFTFSNYGMNWIRQAPKKGLEWIALIYYNSNKKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLEMNSLRSEDAMYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGMVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMIKSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT

		EPVLDSGDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNNSYSCSVVHEGLH NHHTTKSFSRTPGK*
196	Вариабельный домен легкой цепи PI-3028- AB	DVQMTQSPSYLAASPGESVSISCKASKSIGTFLAWYQEKP EKTNKLLIYSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRNLEPED FAVYYCQQHDEYPFTFGSGTKLEIK
197	CDR-L1 PI- 3028-AB	KASKSIGTFLA
198	CDR-L2 PI- 3028-AB	SGSTLQS
199	CDR-L3 PI- 3028-AB	QQHDEYPFT
200	Легкая цепь PI- 3028-AB	DVQMTQSPSYLAASPGESVSISCKASKSIGTFLAWYQEKP EKTNKLLIYSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRNLEPED FAVYYCQQHDEYPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSE QLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS WTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS TSPIVKSFNRNEC*
201	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3029- AB	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKLSVCVASKFTFSNYGMNWIRQ APKKGLEWIALIYYNSNKKYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLEMNSLRSEDAMYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGMVT VSS
202	CDR-H1 PI- 3029-AB	KFTFSNYGMN
203	CDR-H2 PI- 3029-AB	LIYYNSNKKY
204	CDR-H3 PI- 3029-AB	SLTGGSDYFDS
205	Тяжелая цепь PI-3029-AB	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKLSVCVASKFTFSNYGMNWIRQ APKKGLEWIALIYYNSNKKYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLEMNSLRSEDAMYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGMVT VSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPV TLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS QSITCNVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLL

		GGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMS GKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEE EMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT EPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLH NHHTTKSFSRTPGK*
206	Вариабельный домен легкой цепи PI-3029- AB	DVQMTQSPSYLAASPGESVVISCKASKSIGTFLAWYQEKP EKTNKKLIYSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRNLEPED FAVYYCQQHDEYPFTFGSGTKLEIK
207	CDR-L1 PI- 3029-AB	KASKSIGTFLA
208	CDR-L2 PI- 3029-AB	SGSTLQS
209	CDR-L3 PI- 3029-AB	QQHDEYPFT
210	Легкая цепь PI- 3029-AB	DVQMTQSPSYLAASPGESVVISCKASKSIGTFLAWYQEKP EKTNKKLIYSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRNLEPED FAVYYCQQHDEYPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSE QLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNS WTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS TSPIVKSFNRNEC*
211	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3032- AB	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASKFTFSNYGMNWIRQ APGKGLEWIALIYNSNKKYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGLVT VSS
212	CDR-H1 PI- 3032-AB	KFTFSNYGMN
213	CDR-H2 PI- 3032-AB	LIYNSNKKY
214	CDR-H3 PI- 3032-AB	SLTGGSDYFDS
215	Тяжелая цепь PI-3032-AB	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASKFTFSNYGMNWIRQ APGKGLEWIALIYNSNKKYYADSVKGRFTISRDNKNTL

		YLQMNSLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*
216	Вариабельный домен легкой цепи PI-3032- AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIGTFLAWYQQKP GKAPKLLIYSGSTLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQQHDEYPFTFGQGTKLEIK
217	CDR-L1 PI- 3032-AB	KASKSIGTFLA
218	CDR-L2 PI- 3032-AB	SGSTLQS
219	CDR-L3 PI- 3032-AB	QQHDEYPFT
220	Легкая цепь PI- 3032-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIGTFLAWYQQKP GKAPKLLIYSGSTLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQQHDEYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC*
221	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3033- AB	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASKFTFSNYGMNWIRQ APGKGLEWIALIYYNSNKKYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGLVT VSS
222	CDR-H1 PI- 3033-AB	KFTFSNYGMN
223	CDR-H2 PI- 3033-AB	LIYYNSNKKY

224	CDR-H3 PI-3033-AB	SLTGGSDYFDS
225	Тяжелая цепь PI-3033-AB	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASKFTFSNYGMNWIRQ APGKGLEWIALIYYNSNKKYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*
226	Вариабельный домен легкой цепи PI-3033-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIGTFLAWYQQKP GKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHDEYPFTFGQGTKLEIK
227	CDR-L1 PI-3033-AB	KASKSIGTFLA
228	CDR-L2 PI-3033-AB	SGSTLQS
229	CDR-L3 PI-3033-AB	QQHDEYPFT
230	Легкая цепь PI-3033-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIGTFLAWYQQKP GKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHDEYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC*
231	Вариабельный домен тяжелой цепи HX-3011	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAVNWVKQ APGNGLKWMGWINTQTGKPTYADDFKQRFVFSLETSAST SFLQINNLNIEDTATYFCTRDSYYYSSSLDYWGQGMVT VSS

232	CDR-H1 HX-3011	GYTFTDYAVN
233	CDR-H2 HX-3011	WINTQTGKPT
234	CDR-H3 HX-3011	DSYYYSSSLDY
235	Тяжелая цепь HX-3011	<p> QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAVNWVKQ APGNGLKWMGWINTQTGKPTYADDFKQRFVFSLETSAST SFLQINNLNIEDTATYFCTRDSYYYSSSLDYWGQGVMVT VSSAETTAPSVYPLAPGTALKSNSMVTLGCLVKGYFPEPV TVTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWSS QAVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRECNPCGCTGSEVSSVFI FPPKTKDVLTTITLTPKVTCVVVDISQNDPEVRFSWFIDDVE VHTAQTHAPEKQSNSTLRSVSELPVHRDWLNGKTFKCK VNSGAFPAPIEKSSISKPEGTPRGPQVYTMAPPKEEMTQSQ VSITCMVKGFYPPDIYTEWKMNQQPQENYKNTPTMDTD GSYFLYSKLNKVKETWQQGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKS LSHSP* </p>
236	Вариабельный домен легкой цепи HX-3011	<p> DIQMTQSPASLSASLGETVSIIECLASAGISNDLAWYQQKS GKSPQLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRFSLKISDMQPE DEADYFCQQSYKYPWTFGGGKLELK </p>
237	CDR-L1 HX-3011	LASAGISNDLA
238	CDR-L2 HX-3011	AASRLQD
239	CDR-L3 HX-3011	QQSYKYPWT
240	Легкая цепь HX-3011	<p> DIQMTQSPASLSASLGETVSIIECLASAGISNDLAWYQQKS GKSPQLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRFSLKISDMQPE DEADYFCQQSYKYPWTFGGGKLELKRAAAPTVSIFPPS TEQLATGGASVVCLMNNFYPRDISVKWKIDGTERRDGVL DSVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTKADYESHNLTYTCEVVHK TSSSPVVKSFNRNEC* </p>
241	Вариабельный	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAVNWVKQ

	домен тяжелой цепи PI-3030-AB	APGNGLKWMGWINTQTGKPTYADDFKQRFVFSLETSAST SFLQINNLNIEDTATYFCTRDSYYYSSSLDYWGQGVMVT VSS
242	CDR-H1 PI-3030-AB	GYTFTDYAVN
243	CDR-H2 PI-3030-AB	WINTQTGKPT
244	CDR-H3 PI-3030-AB	DSYYYSSSLDY
245	Тяжелая цепь PI-3030-AB	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAVNWVKQ APGNGLKWMGWINTQTGKPTYADDFKQRFVFSLETSAST SFLQINNLNIEDTATYFCTRDSYYYSSSLDYWGQGVMVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*
246	Вариабельный домен легкой цепи PI-3030-AB	DIQMTQSPASLSASLGETVSIIECLASAGISNDLAWYQQKS GKSPQLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRFSLKISDMQPE DEADYFCQQSYKYPWTFGGGTKLELK
247	CDR-L1 PI-3030-AB	LASAGISNDLA
248	CDR-L2 PI-3030-AB	AASRLQD
249	CDR-L3 PI-3030-AB	QQSYKYPWT
250	Легкая цепь PI-3030-AB	DIQMTQSPASLSASLGETVSIIECLASAGISNDLAWYQQKS GKSPQLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRFSLKISDMQPE DEADYFCQQSYKYPWTFGGGTKLELKRTVAAPSVFIFPPS

		DEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC*
251	Вариабельный домен тяжелой цепи HX-3043	QVNLLQSRAALVKPGASVKLSCKASGYTFTDYHLHWVK QSHAKSLEWIGYINPNNA YTSYNEKFKSKATLTVDKSTNT AYMELSRLLTSADSATYYCARDTTDYINLHFAYWGQGT LTVSS
252	CDR-H1 HX- 3043	GYTFTDYHL
253	CDR-H2 HX- 3043	YINPNNA YTS
254	CDR-H3 HX- 3043	DTTDYINLHFAY
255	Тяжелая цепь HX-3043	QVNLLQSRAALVKPGASVKLSCKASGYTFTDYHLHWVK QSHAKSLEWIGYINPNNA YTSYNEKFKSKATLTVDKSTNT AYMELSRLLTSADSATYYCARDTTDYINLHFAYWGQGT LTVSSAETTAPSVYPLAPGTALKSNSMVTLGCLVKGYFPE PVTVTWNSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTW SSQAVTCNVAHPASSTKVDKIVPRECNPCGCTGSEVSSV FIFPPKTKDVLITLTPKVTCTVVVDISQNDPEVRFSWFIDD VEVHTAQTHAPEKQSNSTLRSVSELPVHRDWLNGKTFKC KVNSGAFPAPIEKSSISKEGTPRGPQVYTMAPPKEEMTQS QVSITCMVKGFPDIYTEWKMNQGPQENYKNTPTMDT DGSYFLYSKLNVKKTWQQGNTFTCSVLHEGLHNHHTEK LSHSP*
256	Вариабельный домен легкой цепи HX-3043	DIQMTQSPASLSASLGETVSI ECLTSEGISNDLAWYQQKSG KSPQLLIYDASRL EDGVPSRFSGSGS GTRYSLKISGMQTED EADYFCQQSYKYPLTFGSGTKLEIK
257	CDR-L1 HX- 3043	LTSEGISNDLA
258	CDR-L2 HX- 3043	DASRL ED
259	CDR-L3 HX- 3043	QQSYKYPLT

260	Легкая цепь HX-3043	DIQMTQSPASLSASLGETVSIIECLTSEGISNDLAWYQQKSG KSPQLLIYDASRLEDGVPSRFGSGSGTRYSLKISGMQTED EADYFCQQSYKYPLTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSTE QLATGGASVVCLMNNFYPRDISVKWKIDGTERRDGVLDL VTDQDSKDYSTYSMSSTLSLTKADYESHNLTYTCEVVHKTSS SPVVKSFNRNEC*
261	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3031- AB	QVNLLQSRAALVKPGASVKLSCKASGYTFTDYHLHWVK QSHAKSLEWIGYINPNNAYTSYNEKFKSKATLTVDKSTNT AYMELSRLLTSADSATYYCARDTTDYNNLHFAYWGQGTL VTVSS
262	CDR-H1 PI- 3031-AB	GYTFTDYHL
263	CDR-H2 PI- 3031-AB	YINPNNAYTS
264	CDR-H3 PI- 3031-AB	DTTDYNNLHFAY
265	Тяжелая цепь PI-3031-AB	QVNLLQSRAALVKPGASVKLSCKASGYTFTDYHLHWVK QSHAKSLEWIGYINPNNAYTSYNEKFKSKATLTVDKSTNT AYMELSRLLTSADSATYYCARDTTDYNNLHFAYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYIT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK*
266	Вариабельный домен легкой цепи PI-3031- AB	DIQMTQSPASLSASLGETVSIIECLTSEGISNDLAWYQQKSG KSPQLLIYDASRLEDGVPSRFGSGSGTRYSLKISGMQTED EADYFCQQSYKYPLTFGSGTKLEIK
267	CDR-L1 PI- 3031-AB	LTSEGISNDLA

268	CDR-L2 3031-AB	PI-	DASRLED
269	CDR-L3 3031-AB	PI-	QQSYKYPLT
270	Легкая цепь 3031-AB	PI-	DIQMTQSPASLSASLGETVSIIECLTSEGISNDLAWYQQKSG KSPQLLIYDASRLEDGVPSRFSGSGSGTRYSLKISGMQTED EADYFCQQSYKYPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC*
271	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3006- AB	PI-	EVQLVESGGGLVKPGASLKLSCVASGFTFSDYWMNWVR QTPGKTMEWIGDIKDDGSYTNYPSTLKNRFTISRDNAST LYLQMNNVRSIEDTGTYYCTSGGVFDYWGQGVMTVSS
272	CDR-H1 3006-AB	PI-	GFTFSDYW
273	CDR-H2 3006-AB	PI-	IKDDGSYT
274	CDR-H3 3006-AB	PI-	TSGGVFDY
275	Тяжелая цепь PI-3006-AB	PI-	EVQLVESGGGLVKPGASLKLSCVASGFTFSDYWMNWVR QTPGKTMEWIGDIKDDGSYTNYPSTLKNRFTISRDNAST LYLQMNNVRSIEDTGTYYCTSGGVFDYWGQGVMTVSSA KTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTW NSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITC NVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSV FIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFN VEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFK CKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTK KQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL DSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNNH TTKSFSRTPGK*
276	Вариабельный домен легкой	PI-	EIVLTQSPPTMAASPGEMVTTTCRASSSVNYMHWFQQKS GTSPKPWIYDTSKLAGVDPDRFSGSGSGTSYSLTISSEAE

	цепи PI-3006-AB	DAASYCYLQRSTFPPTFGAGTKLELK
277	CDR-L1 PI-3006-AB	SSVNY
278	CDR-L2 PI-3006-AB	DTS
279	CDR-L3 PI-3006-AB	LQRSTFPPT
280	Легкая цепь PI-3006-AB	EIVLTQSPPTMAASPGEMVTITCRASSSVNYMHWFQQKS GTSPKPWIYDTSKLAGVDPDRFSGSGGTSYSLTISSMEAE DAASYCYLQRSTFPPTFGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSS EQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLN SWTDQDSKDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKT STSPIVKSFNRECS*
281	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3007-AB	QVRLVQSGTALVRPGASVRMSCTASGYSFTDYWVSWVK QSHGQSLEWIGEIYPNSGTTNFNEKFEGKATLTVDKSTST AYMELSRLTSEDSAIYYCTGEGTFDYWGQGVMTVSS
282	CDR-H1 PI-3007-AB	GYSFTDYW
283	CDR-H2 PI-3007-AB	IYPNSGTT
284	CDR-H3 PI-3007-AB	TGEGTFDY
285	Тяжелая цепь PI-3007-AB	QVRLVQSGTALVRPGASVRMSCTASGYSFTDYWVSWVK QSHGQSLEWIGEIYPNSGTTNFNEKFEGKATLTVDKSTST AYMELSRLTSEDSAIYYCTGEGTFDYWGQGVMTVSSAK TTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWN SGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCN VAHPASSTKVDKKEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVE VHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCK VNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQ VTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSD

		GSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTK SFSRTPGK*
286	Вариабельный домен легкой цепи PI-3007- AB	EIVLTQSPTTMAASPGEKVTITCRPSSSLSNMHWFQQKSG TSPKPWIYDTSKLAGVPDRFSGSGSGTSYSLTISSMEAED AATYYCLQRSSYPPTFGAGTKLELK
287	CDR-L1 PI- 3007-AB	SSLSN
288	CDR-L2 PI- 3007-AB	DTS
289	CDR-L3 PI- 3007-AB	LQRSSYPPT
290	Легкая цепь PI- 3007-AB	EIVLTQSPTTMAASPGEKVTITCRPSSSLSNMHWFQQKSG TSPKPWIYDTSKLAGVPDRFSGSGSGTSYSLTISSMEAED AATYYCLQRSSYPPTFGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSE QLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNS WTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS TSPIVKSFNRNEC*
291	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3008- AB	EVQLVESGGGLVKPGASLKLSCVASGFTFSDDWMNWVR QTPGKAMEWIGDIKYDGSYTNYPVSLKNRLTISRDNACKN TLYLQMTNVRSEDTATYYCTSGGVFDYWGQGVMVTVSS
292	CDR-H1 PI- 3008-AB	GFTFSDDW
293	CDR-H2 PI- 3008-AB	IKYDGSYT
294	CDR-H3 PI- 3008-AB	TSGGVFDY
295	Тяжелая цепь PI-3008-AB	EVQLVESGGGLVKPGASLKLSCVASGFTFSDDWMNWVR QTPGKAMEWIGDIKYDGSYTNYPVSLKNRLTISRDNACKN TLYLQMTNVRSEDTATYYCTSGGVFDYWGQGVMVTVSS AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLT WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSIT CNVAHPASSTKVDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPS

		VFIFPPKIKDVLMI ^S LSP ^I VT ^C VV ^V DV ^S EDDPDVQISW ^F VN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH ^Q DWMSGKEF KCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMT KKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDS ^D GSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNH HTTKSFSRTPGK*
296	Вариабельный домен легкой цепи PI-3008- AB	EIVLSQSPTTMAASPGEKVTITCRASSSVSYMHWFQQKSG TSPKPWIYDTSK ^L ASGVPDRFSGSGSGTSYSLTISSMEAED AATYYCLQRSGYPPTFGAGTKLEVK
297	CDR-L1 PI- 3008-AB	SSVS ^Y
298	CDR-L2 PI- 3008-AB	DTS
299	CDR-L3 PI- 3008-AB	LQRSGYPPT
300	Легкая цепь PI- 3008-AB	EIVLSQSPTTMAASPGEKVTITCRASSSVSYMHWFQQKSG TSPKPWIYDTSK ^L ASGVPDRFSGSGSGTSYSLTISSMEAED AATYYCLQRSGYPPTFGAGTKLEVKRADAAPT ^V SIFPPSS EQLTSGGASVVCFLNNFY ^P PKDINVKWKIDG ^S ERQNGVLN SWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKT STSPIVKSFNRNEC*
301	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3009- AB	EVQLVESGGGLVQPGRSLKFSCSASGFTFSAYSMAWVRQ APKTGLEWVATI ^I YDGSSTYRDSVKGRFTISRDN ^A KNTL YLQMDSLRSEDTATYYCARLGYS ^G HYFDYWGQGV ^M VT VSS
302	CDR-H1 PI- 3009-AB	GFTFSAYS
303	CDR-H2 PI- 3009-AB	I ^I YDGSST
304	CDR-H3 PI- 3009-AB	ARLGYS ^G HYFDY
305	Тяжелая цепь PI-3009-AB	EVQLVESGGGLVQPGRSLKFSCSASGFTFSAYSMAWVRQ APKTGLEWVATI ^I YDGSSTYRDSVKGRFTISRDN ^A KNTL

		YLQMDSLRS EDTATYYCARLGYSGHYFDYWGQGMVT VSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPV TLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS QSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLL GGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMS GKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEE EMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT EPVLDS DGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLH NHHTTKSFSRTPGK*
306	Вариабельный домен легкой цепи PI-3009- AB	DTVLTQSPALAVSLGQRVTISCQASESVSSSLHSYLHWYQ QKPGQQPKLLIYRASNLESGV PARFSGSGSGTDFTLNIDPV EADDIATYFCQQSWNDPRTFGGGTKLELK
307	CDR-L1 PI- 3009-AB	ESVSSSLHSY
308	CDR-L2 PI- 3009-AB	RAS
309	CDR-L3 PI- 3009-AB	QQSWNDPRT
310	Легкая цепь PI- 3009-AB	DTVLTQSPALAVSLGQRVTISCQASESVSSSLHSYLHWYQ QKPGQQPKLLIYRASNLESGV PARFSGSGSGTDFTLNIDPV EADDIATYFCQQSWNDPRTFGGGTKLELK RADAAPTVSIF PPSSEQLTSGGASVVCFLN NFYPKDINVKWKIDGSERQNG VLNSWTDQDSKDYMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEAT HKTSTSPIVKSFN RNEC*
311	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3036- AB	VQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTDYAVNWVRQ APGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRVTMTRDTSTS TVYMELSSLRSEDTAVYYCARD SYYYSSSLDYWGQGLTV TVSS
312	CDR-H1 PI- 3036-AB	GYTFTDYAVN
313	CDR-H2 PI- 3036-AB	WINTQTGKPT

314	CDR-H3 PI-3036-AB	DSYYYSSSLDY
315	Тяжелая цепь PI-3036-AB	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDYAVNWVR QAPGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRVTMTRDTST STVYMESSLRSEDNAVYYCARDSSYYYSSSLDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK*
316	Вариабельный домен легкой цепи PI-3036-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQK PKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQSYKYPWTFGQGTKLEIK
317	CDR-L1 PI-3036-AB	RASAGISNDLA
318	CDR-L2 PI-3036-AB	AASRLQD
319	CDR-L3 PI-3036-AB	QQSYKYPWT
320	Легкая цепь PI-3036-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQK PKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQSYKYPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC*
321	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3037-AB	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDYAVNWVR QAPGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRVTMTLDTST STAYMESSLRSEDNAVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGT LVTVSS

322	CDR-H1 3037-AB	PI-	GYTFTDYAVN
323	CDR-H2 3037-AB	PI-	WINTQTGKPT
324	CDR-H3 3037-AB	PI-	DSYYYSSSLDY
325	Тяжелая цепь PI-3037-AB		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAVNWVR QAPGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRVTMTLDTST STAYMELSSLRSEDNAVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK*
326	Вариабельный домен легкой цепи PI-3037- AB		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQK PKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPE DFATYYCQQSYKYPWTFGQGTKLEIK
327	CDR-L1 3037-AB	PI-	RASAGISNDLA
328	CDR-L2 3037-AB	PI-	AASRLQD
329	CDR-L3 3037-AB	PI-	QQSYKYPWT
330	Легкая цепь PI- 3037-AB		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQK PKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPE DFATYYCQQSYKYPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC*

331	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3038-AB	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYAVNWVR QAPGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRFTFTLDTSTS TAYLEISSLRSEDTAVYYCTRDSYSSSLDYWGQGLVTVSS
332	CDR-H1 PI-3038-AB	GYTFTDYAVN
333	CDR-H2 PI-3038-AB	WINTQTGKPT
334	CDR-H3 PI-3038-AB	DSYSSSLDY
335	Тяжелая цепь PI-3038-AB	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYAVNWVR QAPGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRFTFTLDTSTS TAYLEISSLRSEDTAVYYCTRDSYSSSLDYWGQGLVTVSS VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*
336	Вариабельный домен легкой цепи PI-3038-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKPGKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPEDFATYYCQQSYKYPWTFGQGTKLEIK
337	CDR-L1 PI-3038-AB	RASAGISNDLA
338	CDR-L2 PI-3038-AB	AASRLQD
339	CDR-L3 PI-3038-AB	QQSYKYPWT
340	Легкая цепь PI-3038-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKPGKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPE

		DFATYYCQQSYKYPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC*
341	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3039- AB	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAVNWVR QAPGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRVTMTLDTST STSYMELSSLRSEDNAVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGTL VTVSS
342	CDR-H1 PI- 3039-AB	GYTFTDYAVN
343	CDR-H2 PI- 3039-AB	WINTQTGKPT
344	CDR-H3 PI- 3039-AB	DSYYYSSSLDY
345	Тяжелая цепь PI-3039-AB	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAVNWVR QAPGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRVTMTLDTST STSYMELSSLRSEDNAVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYIT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK*
346	Вариабельный домен легкой цепи PI-3039- AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPE DFATYYCQQSYKYPWTFGQGTKLEIK
347	CDR-L1 PI- 3039-AB	RASAGISNDLA
348	CDR-L2 PI- 3039-AB	AASRLQD

349	CDR-L3 PI- 3039-AB	QQSYKYPWT
350	Легкая цепь PI- 3039-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPE DFATYYCQQSYKYPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC*
351	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3040- AB	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYAVNWVR QAPGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRFTFTLDTSTS TSYLEISSLRSEDTAVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGLVT VSS
352	CDR-H1 PI- 3040-AB	GYTFTDYAVN
353	CDR-H2 PI- 3040-AB	WINTQTGKPT
354	CDR-H3 PI- 3040-AB	DSYYYSSSLDY
355	Тяжелая цепь PI-3040-AB	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYAVNWVR QAPGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRFTFTLDTSTS TSYLEISSLRSEDTAVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*
356	Вариабельный домен легкой цепи PI-3040- AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPE DFATYYCQQSYKYPWTFGQGTKLEIK

357	CDR-L1 3040-AB	PI-	RASAGISNDLA
358	CDR-L2 3040-AB	PI-	AASRLQD
359	CDR-L3 3040-AB	PI-	QQSYKYPWT
360	Легкая цепь 3040-AB	PI-	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASAGISNDLAWYQQKPGKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPEDFATYYCQQSYKYPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
361	Вариабельный домен тяжелой цепи 3092	PI-HX-	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYTLWVRQP PGKGLEWIGAIWGGDNTDYNALKSRLSITWDTSKSQVL LKMNSLQTEDTAIFYCTRELGGSFYWGQGMVTVSS
362	CDR-H1 HX-3092	PI-	GFSLTSYTLS
363	CDR-H2 HX-3092	PI-	AIWGGDNTD
364	CDR-H3 HX-3092	PI-	ELGGSFY
365	Тяжелая цепь PI-HX-3092		QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYTLWVRQP PGKGLEWIGAIWGGDNTDYNALKSRLSITWDTSKSQVL LKMNSLQTEDTAIFYCTRELGGSFYWGQGMVTVSSAE TTAPSVYPLAPGTALKSNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTW NSGALSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWSSQAVT CNVAHPASSTKVDKIVPRECNPCGCTGSEVSSVFIFPPKT KDVLTITLTPKVTCTVVDISQNDPEVRFVWFIDDEVHTA QTHAPEKQSNSTLRSVSELPVHRDWLNGKTFKCKVNSG AFPAPIEKSSISKPEGTPRGPQVYTMAPPKEEMTQSQVSITC MVKGFYPPDIYTEWKMNGQPQENYKNTPTMDTDGSYF LYSKLNVKKETWQQGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHS P*

366	Вариабельный домен легкой цепи PI-HX- 3092	DIQMTQSPVLSASVGDRVTLSCCKTSQNINKKLDWYQQK HGEAPKLLIYYTNNLQTGIPSRFSGSGSGTDFLTISTLQPE DVATYYCYQYDSGFTFGAGTKLELK
367	CDR-L1 PI-HX- 3092	KTSQNINKKLD
368	CDR-L2 PI-HX- 3092	YTNNLQT
369	CDR-L3 PI-HX- 3092	YQYDSGFT
370	Легкая цепь PI- HX-3092	DIQMTQSPVLSASVGDRVTLSCCKTSQNINKKLDWYQQK HGEAPKLLIYYTNNLQTGIPSRFSGSGSGTDFLTISTLQPE DVATYYCYQYDSGFTFGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPST EQLATGGASVVCLMNNFYPRDISVKWKIDGTERRDGVLD SVTDQDSKDSTYSMSSTLSLTKADYESHNLTYTCEVVHKTS SSPVVKSFNREK
371	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3035- AB	QVQLKESGPGVLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYTLWVRQP PGKGLEWIGAIWGGDNTDYNALSKSRLSISRDTSKSQVLL KMNSLQTEDTAIYFCTRELGGSFYWGQGMVTVSS
372	CDR-H1 PI- 3035-AB	GFSLTSYTLS
373	CDR-H2 PI- 3035-AB	AIWGGDNTD
374	CDR-H3 PI- 3035-AB	ELGGSFY
375	Тяжелая цепь PI-3035-AB	QVQLKESGPGVLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYTLWVRQP PGKGLEWIGAIWGGDNTDYNALSKSRLSISRDTSKSQVLL KMNSLQTEDTAIYFCTRELGGSFYWGQGMVTVSSAKT TAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNS GSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSVTVTSSTWPSQSITCNV AHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIF PPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNE VHTAQTQTHREDYNSLTLRVVSAALPIQHQQDWMSGKEFKCK

		VNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQ VTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSD GSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTK SFSRTPGK*
376	Вариабельный домен легкой цепи PI-3035- AB	DIQMTQSPVLSASVGDRVTLSCCKTSQNINKKLDWYQQK HGEAPKLLIYYTNNLQGTGIPSRFSGSGSGTDFLTISTLQPE DVATYYCYQYDSGFTFGAGTKLELK
377	CDR-L1 PI- 3035-AB	KTSQNINKKLD
378	CDR-L2 PI- 3035-AB	YTNNLQT
379	CDR-L3 PI- 3035-AB	YQYDSGFT
380	Легкая цепь PI- 3035-AB	DIQMTQSPVLSASVGDRVTLSCCKTSQNINKKLDWYQQK HGEAPKLLIYYTNNLQGTGIPSRFSGSGSGTDFLTISTLQPE DVATYYCYQYDSGFTFGAGTKLELK KRADAAPTVSIFPPSS EQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLN SWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKT STSPIVKSFNRNEC
381	Консенсусная последовательн ость CDR-L1 HX-3011	XASAGISNDLA
382	Консенсусная последовательн ость CDR-L1 HX-3061	XASKSIGTFLA
383	Консенсусная последовательн ость CDR-L1 HX-3031	XASEGISNDLA
384	Белок MARCO человека	MRNKKILKEDELLSETQQA AFHQIAMEPFEINVPKPKRRN GVNFSLAVVVIYLILLTAGA

	UNIPROT Q9UEW3	<p> GLLVVQVLNLQARLRVLEMYFLNDTLAAEDSPSFSLLQS AHPGEHLAQGASRLQVLQAQL TWVRVSHEHLLQRVDNFTQNPGMFRIKGEQGAPGLQGH KGAMGMPGAPGPPGPPAEKGAK GAMGRDGATGPSGPQGPVKGGEAGLQGPQGAPGKQGA TGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPK GETGTKGEKGDGLPLGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGS KGDFGRPGPPGLAGFPGAKGDQ GQPGLQGVPGPPGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPGSP GSPGATGLKGSKGDGTGLQGGQ GRKGESGVPGPAGVKGEQSPGLAGPKGAPGQAGQKGD QGVKGSSGEQGVKGEKGERGEN SVSVRIVGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDEWQNSDAIVFC RMLGYSKGRALYKVGAGTGQ IWLDNVQCRGTESTLWSCTKNSWGHHDCSHEEDAGVEC SV </p>
385	кДНК HC PI- 3010-AB	<p> ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGGTGGCGGCG GCTACTGGAGTGCAGTCACAAGTGCAACTTAAGGAATC CGGACCGGGACTCGTGCAGCCGTCACAACTCTTTCGC TTACCTGTACCGTGTCCGATTTTCCCTGACTTCCTACC ATGTGTCCTGGGTCAGACAGCCTCCTGGAAAGGGACTG GAATGGATGGGTGCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGC GTATAACTCGCTGCTGAAGTCGCGCTTGTCCATTTGAG AGATACTCCAAGTCCCAAGTGTTTCTGAAGATGAACT CCCTGCAAACTGAAGATACTGCCACTTACTACTGTGCC CGCGATCTGTCCGACTATTACTCGAGTTACACCTCGTTC GATTACTGGGGACAGGGTGAATGGTCACTGTGTCGAC TGCCAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA </p>

		<p>TCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCAGCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAATAG</p>
386	кДНК LC PI- 3010-AB	<p>ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTT GCTGCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAA TGACTCAGTCCCCCGCCTCGCTTTCAACCTCCCTGGGAG AAACCGTGTCCATCGAATGCCTGGCTTCCGAAGGGATT TCCAACGATCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGTCCGGAAA GTCACCTCAGCTCCTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGC AGGACGGCGTGCCTTCCCGCTTTTCCGGTTCGGGATCA GGGACTCGGTACTIONCGCTGAAGATTTCCGGGATGCAGCC TGAGGACGAAGCGGACTACTTCTGCCAACAACTCCTACA AGTACCCGCTGACCTTCGGCTCCGGCACCAAGCTCGAA ATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTC TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG CCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG</p>

		AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA
387	кДНК HC PI- 3011-AB	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCG GCTACTGGAGTGCAGTCACAAGTGCAACTTCAAGAATC CGGACCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAACTCTTTCGC TTACCTGTACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACC ATGTGTCCTGGATCAGACAGCCTCCTGGAAAGGGACTG GAATGGATCGGTGCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGC GTATAACCCGTCCCTGAAGTCGCGCGTACTATTTCCG TGGATACCTCCAAGAACCAATTCAGCCTGAAGTTGTCC TCCGTGACTGCCGCCGATACTGCCGTATACTACTGTGCC CGCGATCTGTCCGACTATTACTCGAGTTACACCTCGTTC GATTACTGGGGACAGGGTACTCTGGTCACTGTGTCGTC GGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTGCGTGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA TCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGC ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCCAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAAGCGTCCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCAGCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA

		GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAATAG
388	кДНК LC PI- 3011-AB	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTT GCTGCTCTGGCTCTCCGAGCGCGCTGTGACATCCAAA TGACTCAGTCCCCCTCATCGCTTTCAGCCTCCGTGGGAG ACAGAGTGACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATT TCCAACGATCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAA GGCCCCTAAGCTCCTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGC AGTCCGGCGTGCCTTCCCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAG GGACTGACTTCACCCTGACCATTTCCAGCCTGCAGCCT GAGGACTTCGCGACCTACTACTGCCAACAATCCTACAA GTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGGCACCAAGCTCGAAA TCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA
389	кДНК HC PI- 3012-AB	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCG GCTACTGGAGTGCAGTCACAAGTGCAACTTCAAGAATC CGGACCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAACTCTTTCGC TTACCTGTACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACC ATGTGTCCTGGGTCAGACAGCCTCCTGGAAAGGGACTG GAATGGATCGGTGCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGC GTATAACCCGTCCTGAAGTCGCGCGTAACTATTTCGA GAGATACCTCCAAGAACCAAGTGTCCCTGAAGCTGTGC TCCGTGACTGCCGCCGATACTGCCGTGTACTACTGTGCC CGCGATCTGTCCGACTATTACTCGAGTTACACCTCGTTC

		<p>GATTACTGGGGACAGGGTACTCTGGTCACTGTGTGTCGTC GGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA TCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGC ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCAGCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAATAG</p>
390	кДНК LC PI- 3012-AB	<p>ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTT GCTGCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAA TGA CT CAGTCCCCCTCATCGCTTTCAGCCTCCGTGGGAG ACAGAGTGACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATT TCCAACGATCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAA GGCCCCTAAGCTCCTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGC AGTCCGGCGTGCCTTCCCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAG</p>

		<p>GGACTGACTACACCCTGACCATTTCCAGCCTGCAGCCT GAGGACTTCGCGACCTACTACTGCCAACAATCCTACAA GTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGGCACCAAGCTCGAAA TCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA</p>
391	кДНК HC PI- 3013-AB	<p>ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCG GCTACTGGAGTGCAGTCACAAGTGCAACTTCAAGAATC CGGACCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAACTCTTTCGC TTACCTGTACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACC ATGTGTCCTGGGTCAGACAGCCTCCTGGAAAGGGACTG GAATGGATCGGTGCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGC GTATAACCCGTCCCTGAAGTCGCGCGTAACTATTTTGA GAGATACCTCCAAGAACCAAGTGTCCCTGAAGCTGTGC TCCGTGACTGCCGCCGATACTGCCGTGTACTACTGTGCC CGCGATCTGTCCGACTATTACTCGAGTTACACCTCGTTC GATTACTGGGGACAGGGTACTCTGGTCACTGTGTGTCGTC GGCCAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTGCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA TCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGC ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA</p>

		<p>GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCAGCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAATAG</p>
392	кДНК LC PI- 3013-AB	<p>ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTT GCTGCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAA TGA CTCAGTCCCCCTCATCGCTTTCAGCCTCCGTGGGAG ACAGAGTGACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATT TCCAACGATCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAA GGCCCCTAAGCTCCTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGC AGTCCGGCGTGCCTTCCCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAG GGACTGACTACACCCTGACCATTTCCAGCATGCAGCCT GAGGACTTCGCGACCTACTACTGCCAACAATCCTACAA GTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGGCACCAAGCTCGAAA TCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA</p>
393	кДНК HC PI-	<p>ATGGATTGGACTTGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCG</p>

3014-AB	GCTACTGGAGTGCAGTCACAAGTGCAACTTCAAGAATC CGGACCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAACTCTTTCGC TTACCTGTACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACC ATGTGTCCTGGGTCAGACAGCCTCCTGGAAAGGGACTG GAATGGATGGGTGCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGC GTATAACCCGTCCTGAAGTCGCGCTTGACTATTTCGA GAGATACCTCCAAGAACCAAGTGTCGCTGAAGATGTCC TCCCTGACTGCCGCCGATACTGCCGTATACTACTGTGCC CGCGATCTGTCCGACTATTACTCGAGTTACACCTCGTTC GATTACTGGGGACAGGGTACTCTGGTCACTGTGTGTCGTC GGCCAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA TCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCAGCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
---------	--

		AACCACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAATAG
394	кДНК LC PI- 3014-AB	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTT GCTGCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAA TGACTCAGTCCCCCTCATCGCTTTCAGCCTCCGTGGGAG ACAGAGTGACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATT TCCAACGATCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAA GGCCCCTAAGCTCCTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGC AGTCCGGCGTGCCTTCCCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAG GGACTGACTACACCCTGACCATTTCCAGCCTGCAGCCT GAGGACTTCGCGACCTACTACTGCCAACAATCCTACAA GTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGGCACCAAGCTCGAAA TCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA
395	кДНК HC PI- 3015-AB	ATGGATTGGACTTGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCG GCTACTGGAGTGCAGTCACAAGTGCAACTTCAAGAATC CGGACCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAACTCTTTCGC TTACCTGTACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACC ATGTGTCCTGGGTCAGACAGCCTCCTGGAAAGGGACTG GAATGGATGGGTGCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGC GTATAACCCGTCCCTGAAGTCGCGCTTACTATTTCGA GAGATACCTCCAAGAACCAAGTGTGCTGAAGATGTCC TCCCTGACTGCCGCCGATACTGCCGTATACTACTGTGCC CGCGATCTGTCCGACTATTACTCGAGTTACACCTCGTTC GATTACTGGGGACAGGGTACTCTGGTCACTGTGTGTCGTC GGCCAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC

		<p>GGTGTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGCGTGC ACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAA TCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCAGCAACAAAGCCCTCCAGCCCCC ATC GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAATAG</p>
396	кДНК LC PI- 3015-AB	<p>ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTT GCTGCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAA TGA CTAGTCCCCCTCATCGCTTTCAGCCTCCGTGGGAG ACAGAGTGACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATT TCCAACGATCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAA GGCCCCTAAGCTCCTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGC AGTCCGGCGTGCCTTCCCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAG GGACTGACTACACCCTGACCATTTCCAGCATGCAGCCT GAGGACTTCGCGACCTACTACTGCCAACAATCCTACAA GTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGGCACCAAGCTCGAAA TCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC</p>

		CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA
397	кДНК HC PI- 3022-AB	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCG GCTACTGGAGTGCAGTCACAAGTGCAACTTCAAGAATC CGGACCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAACTCTTTCG TTACCTGTACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACC ATGTGTCCTGGGTCAGACAGCCTCCTGGAAAGGGACTG GAATGGATCGGTGCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGC GTATAACCCGTCCCTGAAGTCGCGCGTA ACTATTTGCA GAGATACCTCCAAGAACCAAGTGTCCCTGAAGCTGTG TCCGTGACTGCCGCCGATACTGCCGTGTACTACTGTGCC CGCGATCTGTCCGACTATTACTCGAGTTACACCTCGTTC GATTACTGGGGACAGGGTACTCTGGTCACTGTGTGTCG GGCCAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTGCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA TCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCAGC ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA

		<p>AGTGCAAGGTCAGCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAATAG</p>
398	кДНК LC PI- 3022-AB	<p>ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTT GCTGCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAA TGA CTCAGTCCCCCTCATCGCTTTCAGCCTCCGTGGGAG ACAGAGTGACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATT TCCAACGATCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAA GGCCCCTAAGCTCCTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGC AGGACGGCGTGCCTTCCCGCTTTTCCGGTTCGGGATCA GGGACTGACTACACCCTGACCATTTCCAGCCTGCAGCC TGAGGACTTCGCGACCTACTACTGCCAACAATCCTACA AGTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGGCACCAAGCTCGAA ATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTC TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG CCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTG AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA</p>
399	кДНК HC PI- 3023-AB	<p>ATGGATTGGACTTGCGCTTCTTGTGGTGGCGGCG GCTACTGGAGTGCAGTCACAAGTGCAACTTCAAGAATC CGGACCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAACTCTTTCG TTACCTGTACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCTACC ATGTGTCCTGGGTCAGACAGCCTCCTGGAAAGGGACTG</p>

		<p>GAATGGATCGGTGCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGC GTATAACCCGTCCCTGAAGTCGCGCGTAACTATTTGCA GAGATACCTCCAAGAACCAAGTGTCCCTGAAGCTGTCG TCCGTGACTGCCGCCGATACTGCCGTGTACTACTGTGCC CGCGATCTGTCCGACTATTACTCGAGTTACACCTCGTTC GATTACTGGGGACAGGGTACTCTGGTCACTGTGTGTCGTC GGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTGCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA TCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGC ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCAGCAACAAAGCCCTCCAGCCCCC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAATAG</p>
400	кДНК LC PI-3023-AB	<p>ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTT GCTGCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAA</p>

		<p>TGACTCAGTCCCCCTCATCGCTTCAACCTCCGTGGGAG ACAGAGTGACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATT TCCAACGATCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAA GTCGCCTAAGCTCCTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGC AGTCCGGCGTGCCTTCCCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAG GGACTGACTACACCCTGACCATTTCCAGCCTGCAGCCT GAGGACTTCGCGACCTACTTCTGCCAACAATCCTACAA GTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGGCACCAAGCTCGAAA TCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA</p>
401	кДНК HC PI-3024-AB	<p>ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCG GCTACTGGAGTGCAGTCACAAGTGCAACTTCAAGAATC CGGACCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAACTCTTTCGC TTACCTGTACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACC ATGTGTCCTGGGTCAGACAGCCTCCTGGAAAGGGACTG GAATGGATCGGTGCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGC GTATAACCCGTCCCTGAAGTCGCGCGTAACTATTTCA GAGATACCTCCAAGAACCAAGTGTCCCTGAAGCTGTGC TCCGTGACTGCCGCCGATACTGCCGTGTACTACTGTGCC CGCGATCTGTCCGACTATTACTCGAGTTACACCTCGTTC GATTACTGGGGACAGGGTACTCTGGTCACTGTGTGTCGTC GGCCAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTGCGTGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC</p>

		<p>CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA TCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGC ACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCC CCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCAGCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAATAG</p>
402	кДНК LC PI-3024-AB	<p>ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTT GCTGCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAA TGACTCAGTCCCCCTCATCGCTTCAACCTCCGTGGGAG ACAGAGTGACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATT TCCAACGATCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAA GTCCCCTAAGCTCCTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGC AGGACGGCGTGCCTTCCCGCTTTTCCGGTTCGGGATCA GGGACTGACTACACCCTGACCATTTCCAGCCTGCAGCC TGAGGACGAAGCGACCTACTTCTGCCAACAATCCTACA AGTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGGCACCAAGCTCGAA ATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTC TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG CCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA</p>

		<p>AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA</p>
403	кДНК HC PI- 3025-AB	<p>ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTTTGTGGTGGCGGCG GCTACTGGAGTGCAGTCAGAAGTGCAACTTCAAGAATC CGGACCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAACTCTTTTCGC TTACCTGTACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACC ATGTGTCCTGGGTCAGACAGCCTCCTGGAAAGGGACTG GAATGGATCGGTGCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGC GTATAACCCGTCCTGAAGTCGCGCGTAACTATTTCGA GAGATACCTCCAAGAACCAAGTGTCCCTGAAGCTGTCG TCCGTGACTGCCGCCGATACTGCCGTGTACTACTGTGCC CGCGATCTGTCCGACTATTACTCGAGTTACACCTCGTTC GATTACTGGGGACAGGGTACTCTGGTCACTGTGTGTCGTC GGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGAC GGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA TCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACGC ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCAGCAACAAAGCCCTCCAGCCCCC GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA</p>

		<p>AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAATAG</p>
404	кДНК LC PI- 3025-AB	<p>ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTT GCTGCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAA TGA CTCAGTCCCCCTCATCGCTTTCAGCCTCCGTGGGAG ACAGAGTGACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATT TCCAACGATCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAA GGCCCCTAAGCTCCTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGC AGGACGGCGTGCCTTCCCGCTTTTCCGGTTCGGGATCA GGGACTGACTACACCCTGACCATTTCCAGCCTGCAGCC TGAGGACTTCGCGACCTACTACTGCCAACAATCCTACA AGTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGGCACCAAGCTCGAA ATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTC TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG CCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA</p>
405	кДНК HC PI- 3026-AB	<p>ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCG GCTACTGGAGTGCAGTCAGAAGTGCAACTTCAAGAATC CGGACCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAACTCTTTCGC TTACCTGTACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACC ATGTGTCCTGGGTCAGACAGCCTCCTGGAAAGGGACTG GAATGGATCGGTGCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGC GTATAACCCGTCCCTGAAGTCGCGCGTAACTATTTCGA GAGATACCTCCAAGAACCAAGTGTCCCTGAAGCTGTGCG TCCGTGACTGCCGCCGATACTGCCGTGTACTACTGTGCC</p>

		<p>CGCGATCTGTCCGACTATTACTCGAGTTACACCTCGTTC GATTACTGGGGACAGGGTACTCTGGTCACTGTGTGTCGTC GGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTGCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA TCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACGC ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCAGCAACAAAGCCCTCCAGCCCCC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAATAG</p>
406	кДНК LC PI-3026-AB	<p>ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTT GCTGCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAA TGA CTCAGTCCCCCTCATCGCTTCAACCTCCGTGGGAG ACAGAGTGACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATT TCCAACGATCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAA GTCGCCTAAGCTCCTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGC</p>

		<p>AGTCCGGCGTGCCTTCCCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAG GGACTGACTACACCCTGACCATTTCCAGCCTGCAGCCT GAGGACTTCGCGACCTACTTCTGCCAACAATCCTACAA GTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGGCACCAAGCTCGAAA TCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA</p>
407	кДНК HC PI- 3027-AB	<p>ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCG GCTACTGGAGTGCAGTCAGAAGTGCAACTTCAAGAATC CGGACCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAACTCTTTTCGC TTACCTGTACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACC ATGTGTCCTGGGTCAGACAGCCTCCTGGAAAGGGACTG GAATGGATCGGTGCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGC GTATAACCCGTCCCTGAAGTCGCGCGTAACTATTTCGA GAGATACCTCCAAGAACCAAGTGTCCCTGAAGCTGTGC TCCGTGACTGCCGCCGATACTGCCGTGTAATACTGTGCC CGCGATCTGTCCGACTATTACTCGAGTTACACCTCGTTC GATTACTGGGGACAGGGTACTCTGGTCACTGTGTGTCGTC GGCCAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTGCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA TCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACAGC ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC</p>

		<p>CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCAGCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAATAG</p>
408	кДНК LC PI- 3027-AB	<p>ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTT GCTGCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAA TGACTCAGTCCCCCTCATCGCTTTC AACCTCCGTGGGAG ACAGAGTGACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATT TCCAACGATCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAA GTCCCCTAAGCTCCTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGC AGGACGGCGTGCCTTCCCGCTTTTCCGGTTCGGGATCA GGGACTGACTACACCCTGACCATTTCCAGCCTGCAGCC TGAGGACGAAGCGACCTACTTCTGCCAACAATCCTACA AGTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGGCACCAAGCTCGAA ATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTC TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG CCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTG AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA</p>

409	кДНК НС PI-3030-AB	<p> ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTTTGTGGTGGCGGCG GCTACTGGAGTGCAGTCACAAATCCAGCTCGTGCAGTC CGGGCCAGAGCTGAAAAAGCCCGGAGAATCCGTCAAG ATTAGCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCGACTA CGCAGTGAAC TGGGTCAAGCAGGCCCGGGAAATGGT CTGAAGTGGATGGGCTGGATTAACACGCAGACCGGGA AGCCTACCTACGCCGACGACTTCAAGCAACGGTTCGTG TTCTCGCTTGAACTAGCGCCTCGACCTCGTTCCTGCAA ATCAACAACCTGAACATCGAGGACACCGCCACCTACTT CTGCACAAGAGACTCCTACTATTACTCATCCTCCCTCGA T TACTGGGGACAGGGCGTGATGGTCACTGTGTCCAGCG CCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC TTGTGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCAC CTGA ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCC CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCAGCAACAAGCCCTCCCAGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGC TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA </p>
-----	--------------------	---

		ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGT AAATAG
410	кДНК LC PI- 3030-AB	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTT GCTGCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAA TGA CTCAGTCCCCTGCATCCCTGAGCGCGAGCCTGGGG GAGACTGTGTCCATTGAATGCCTCGCCTCCGCCGGAAT TTCTAACGACCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGTCCGGAA AGTCGCCCCAGCTGCTGATCTACGCCGCTTCGAGGCTT CAGGATGGTGTCCCGTACGGTTTAGCGGATCAGGATC CGGCACCAGATTCTCCCTGAAAATCAGCGACATGCAGC CAGAGGACGAAGCCGACTACTTCTGCCAACAATCGTAC AAGTATCCCTGGACCTTCGGCGGGGGCACCAAGCTCGA ACTGAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCT CTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCT GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA
411	кДНК HC PI- 3036-AB	ATGGACTGGACCTGGAGATTTTTATTCGTCGTCGCTGCC GCCACCGGAGTGCAATCACAAGTACA ACTGGTGCAGA GCGGGGCCGAAGTCAAGAAGCCC GGCGCCTCCGTGAA AGTGTCGTGCAAAGCCTCGGGTTACACATTC ACTGACT ACGCAGTGA ACTGGGTCAGACAGGCACCGGGCCAGGG ACTCGAGTGGATGGGCTGGATCAACACTCAGACTGGGA AGCCACCTATGCTCAGAAGTTCCAGGGAAGGGTCACC ATGACCCGCGACACCAGCACCTCCACCGTGTACATGGA ATTGAGCAGCCTGCGGTCCGAAGATACAGCCGTGTACT ATTGTGCGAGGGACTCCTACTACTCATCCTCGCTCG ACTACTGGGGCCAGGGTACCCTCGTGACCGTTAGCTCG GCCTCTACTAAGGGTCCGTCCGTGTTCCCGTTGGCCCCG AGCTCGAAGTCCACCTCCGGGGGAACCGCTGCGCTTGG

		<p>ATGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACGG TGCCTGGA ACTCCGGGGCCCTGACCTCGGGAGTGAC ACTTCCCTGCGGTGCTGCAGAGCTCAGGACTGTACAG CCTCAGCTCCGTCGTGACCGTGCCTTCGTCCTCGCTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCGA GCAACACCAAGGTGACACAAGAAAGTCGAGCCGAAGTC ATGCGACAAGACTCACACTTGCCCGCCGTGCCCGCGC CTGAGCTTCTTGGCGGGCCCTCCGTGTTCTGTTCCTCGC CAAAGCCCAAGGATACTCTGATGATTCGCGGACTCCT GAAGTGACCTGTGTGGTCGTCGATGTGTCCCATGAGGA CCCCGAGGTCAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTCCACAATGCCAAGACGAAGCCGCGGGAAGAACA GTACA ACTCCACTTATCGCGTGGTGTCCGTGCTCACCGT GCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTACAAG TGCAAAGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCAATTGA AAAGACCATCTCAAAGCGAAGGGCCAGCCGCGCGAA CCACAAGTGTACACCCTGCCTCCTTCCCGGGATGAACT GACCAAGAACCAAGTGTCCCTGACTTGCTCGTGAAGG GTTTCTACCCGTCCGACATCGCCGTGGAATGGGAGAGC AACGGACAGCCCGAGAACAATTACAAGACTACCCAC CCGTGCTCGATTCCGGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCA AGCTGACCGTGGATAAGTCCCGCTGGCAACAGGGAAA CGTGTTCAAGTTGTTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACA ACCACTACACCCAGAAGTCACTGTCCCTGTCTCCGGGA AAATAA</p>
412	кДНК LC PI- 3036-AB	<p>ATGGATATGAGAGTGCCTGCACA ACTTCTTGGATTACT GCTGCTTTGGTTGTGCGGGAGCCAGATGCGATATCCAGA TGACCCAGTCCCCGTGAGCCTGTCAGCTTCCGTGGGC GACCGGGTCACCATTACTTGTGCGGCCTCGGCCGGTAT TAGCAATGACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGA AGGCCCCAAGCTCCTCATCTACGCGGCTTCCCGCCTG CAAGACGGCGTGCCGTCAAGGTTCAAGCGGTTCCGGGCTC CGGAACTGACTTCACCCTCACTATCTCGTCCCTGCAACC CGAAGATTTGCAACCTACTACTGCCAGCAGTCCTATA AGTACCCCTGGACTTTCGGACAAGGCACCAAGCTCGAG</p>

		<p>ATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCGAGCGTGTTTATCTT CCCGCCATCTGACGAACAGCTGAAGTCCGGGACAGCGT CCGTGGTCTGCCTGCTCAACAACCTTCTACCCCCGCGAG GCCAAAGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCGCTGCAGTC CGGAAACAGCCAGGAAAGCGTGACTGAGCAAGACTCC AAGGACTCCACCTACTCCCTGTCATCCACCCTGACGCT GTCCAAGGCCGACTACGAAAAGCACAAGGTCTACGCCT GCGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCAAGCCCTGTGACC AAGTCGTTCAACCGGGGAGAGTGTTAA</p>
413	кДНК НС PI-3038-AB	<p>ATGGACTGGACCTGGAGATTTTTATTCGTCGTCGCTGCC GCCACCGGAGTGCAATCACAAGTACAACCTGGTGCAGA GCGGGGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGGCGCCTCCGTGAA AGTGTCGTGCAAAGCCTCGGGTTACACATTCCTGACT ACGCAGTGAACCTGGGTCAGACAGGCACCGGGCCAGGG ACTCGAGTGGATGGGCTGGATCAACACTCAGACTGGGA AGCCCACCTATGCTCAGAAGTTCCAGGGAAGGGTCACC ATGACCCTGGACACCAGCACCTCCACCGCATAACATGGA ATTGAGCAGCCTGCGGTCCGAAGATACAGCCGTGTACT ATTGTACTAGGGACTCCTACTACTACTCATCCTCGCTCG ACTACTGGGGCCAGGGTACCCTCGTGACCGTTAGCTCG GCCTCTACTAAGGGTCCGTCCGTGTTCCCGTTGGCCCCG AGCTCGAAGTCCACCTCCGGGGGAACCGCTGCGCTTGG ATGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACGG TGTCTTGAACTCCGGGGCCCTGACCTCGGGAGTGAC ACTTTCCCTGCGGTGCTGCAGAGCTCAGGACTGTACAG CCTCAGCTCCGTGCTGACCGTGCCTTCGTCCTCGCTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCGA GCAACACCAAGGTGACAAGAAAGTCGAGCCGAAGTC ATGCGACAAGACTCACACTTGCCCGCCGTGCCCCGCGC CTGAGCTTCTTGGCGGGCCCTCCGTGTTCCCTGTTCCGC CAAAGCCCAAGGATACTCTGATGATTCGCGGACTCCT GAAGTGACCTGTGTGGTCGTCGATGTGTCCCATGAGGA CCCCGAGGTCAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTCCACAATGCCAAGACGAAGCCGCGGGAAGAACA GTACAACCTCACTTATCGCGTGGTGTCCGTGCTCACCGT</p>

		GCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTACAAG TGCAAAGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCAATTGA AAAGACCATCTCAAAGCGAAGGGCCAGCCGCGCGAA CCACAAGTGTACACCCTGCCTCCTTCCCGGGATGAACT GACCAAGAACCAAGTGTCCCTGACTTGCCTCGTGAAGG GTTTCTACCCGTCCGACATCGCCGTGGAATGGGAGAGC AACGGACAGCCCAGACAATTACAAGACTACCCAC CCGTGCTCGATTTCGGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCCA AGCTGACCGTGGATAAGTCCCGCTGGCAACAGGGAAA CGTGTTCAAGTTGTTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACA ACCACTACACCCAGAAGTCACTGTCCCTGTCTCCGGGA AAATAA
414	кДНК LC PI- 3038-AB	ATGGATATGAGAGTGCCTGCACA ACTTCTTGGATTACT GCTGCTTTGGTTGTCGGGAGCCAGATGCGATATCCAGA TGACCCAGTCCCCGTCGAGCCTGTCAGCTTCCGTGGGC GACCGGGTCACCATTACTTGTGCGCCTCGGCCGGTAT TAGCAATGACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGA AGGCCCCAAGCTCCTCATCTACGCGGCTTCCCGCCTG CAAGACGGCGTGCCGTCAAGGTTCAAGCGTTCCGGGCTC CGGAACTGACTTCACCCTCACTATCTCGTCCCTGCAACC CGAAGATTTGCAACCTACTACTGCCAGCAGTCCTATA AGTACCCTGGACTTTCGGACAAGGCACCAAGCTCGAG ATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCGAGCGTGTTTATCTT CCCGCCATCTGACGAACAGCTGAAGTCCGGGACAGCGT CCGTGGTCTGCCTGCTCAACA ACTTCTACCCCGCGAG GCCAAAGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCGCTGCAGTC CGGAAACAGCCAGGAAAGCGTGACTGAGCAAGACTCC AAGGACTCCACCTACTCCCTGTCATCCACCCTGACGCT GTCCAAGGCCGACTACGAAAAGCACAAGGTCTACGCCT GCGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCAAGCCCTGTGACC AAGTCGTTCAACCGGGGAGAGTGTTAA
415	кДНК HC PI- 3039-AB	ATGGACTGGACCTGGAGATTTTATTCGTCGTCGCTGCC GCCACCGGAGTGCAATCACAAGTACA ACTGGTGCAGA GCGGGGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGCCTCCGTGAA AATCTCGTGCAAAGCCTCGGGTTACACATTCAGTACT

		<p> ACGCAGTGA ACTGGGTCAGACAGGCACCGGGCCAGGG ACTCGAGTGGATGGGCTGGATCAACTCAGACTGGGA AGCCCACCTATGCTCAGAAGTTCAGGGAAGGTTACC TTTACCTTGGACACCAGCACCTCCACCGCGTACTTGA AATTAGCAGCCTGCGGTCCGAAGATACAGCCGTGTACT ATTGTACTAGGGACTCCTACTACTCATCCTCGCTCG ACTACTGGGGCCAGGGTACCCTCGTGACCGTTAGCTCG GCCTCTACTAAGGGTCCGTCCGTGTTCCCGTTGGCCCCG AGCTCGAAGTCCACCTCCGGGGGAACCGCTGCGCTTGG ATGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACGG TGTCTTGGAACTCCGGGGCCCTGACCTCGGGAGTGAC ACTTCCCTGCGGTGCTGCAGAGCTCAGGACTGTACAG CCTCAGCTCCGTGCTGACCGTGCCTTCGTCTCGCTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCGA GCAACACCAAGGTGACAAAGAAAGTCGAGCCGAAGTC ATGCGACAAGACTCACACTTGCCCGCCGTGCCCCGCGC CTGAGCTTCTTGGCGGGCCCTCCGTGTTCTGTTCCGC CAAAGCCCAAGGATACTCTGATGATTTTCGCGGACTCCT GAAGTGACCTGTGTGGTCGTCGATGTGTCCCATGAGGA CCCCGAGGTCAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTCCACAATGCCAAGACGAAGCCGCGGGAAGAACA GTACA ACTCCACTTATCGCGTGGTGTCCGTGCTCACCCT GCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTACAAG TGCAAAGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCAATTGA AAAGACCATCTCAAAGCGAAGGGCCAGCCGCGCGAA CCACAAGTGTACACCCTGCCTCCTTCCCGGGATGAACT GACCAAGAACCAAGTGTCCCTGACTTGCCTCGTGAAGG GTTTCTACCCGTCCGACATCGCCGTGGAATGGGAGAGC AACGGACAGCCCGAGAACAATTACAAGACTACCCAC CCGTGCTCGATTCCGGACGGCAGCTTCTTCCCTGTACTCCA AGCTGACCGTGGATAAGTCCCGCTGGCAACAGGGAAA CGTGTTCAAGTTGTTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACA ACCACTACCCAGAAGTCACTGTCCCTGTCTCCGGGA AAATAA </p>
416	кДНК LC PI-	ATGGATATGAGAGTGCCTGCACA ACTTCTTGGATTACT

	3039-AB	<p>GCTGCTTTGGTTGTCGGGAGCCAGATGCGATATCCAGA TGACCCAGTCCCCGTCGAGCCTGTCAGCTTCCGTGGGC GACCGGGTCACCATTACTTGTCGCGCCTCGGCCGGTAT TAGCAATGACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGA AGGCCCCAAGCTCCTCATCTACGCGGCTTCCCGCCTG CAAGACGGCGTGCCGTCAAGGTTCAAGCGGTTCCGGGCTC CGGAACTGACTTCACCCTCACTATCTCGTCCCTGCAACC CGAAGATTTGCAACCTACTACTGCCAGCAGTCCTATA AGTACCCCTGGACTTTCGGACAAGGCACCAAGCTCGAG ATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCGAGCGTGTTTATCTT CCCGCCATCTGACGAACAGCTGAAGTCCGGGACAGCGT CCGTGGTCTGCCTGCTCAACAACCTTCTACCCCCGCGAG GCCAAAGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCGCTGCAGTC CGGAAACAGCCAGGAAAGCGTGACTGAGCAAGACTCC AAGGACTCCACCTACTCCCTGTCATCCACCCTGACGCT GTCCAAGGCCGACTACGAAAAGCACAAGGTCTACGCCT GCGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCAAGCCCTGTGACC AAGTCGTTCAACCGGGGAGAGTGTTAA</p>
417	кДНК HC PI- 3040-AB	<p>ATGGACTGGACCTGGAGATTTTTATTCGTCGTCGCTGCC GCCACCGGAGTGCAATCACAAGTACAACCTGGTGCAGA GCGGGGCCGAAGTCAAGAAGCCCGGGCGCCTCCGTGAA AGTGTCGTGCAAAGCCTCGGGTTACACATTCAGTACT ACGCAGTGAACCTGGGTCAGACAGGCACCGGGCCAGGG ACTCGAGTGGATGGGCTGGATCAACACTCAGACTGGGA AGCCCACCTATGCTCAGAAGTTCCAGGGAAGGGTCACC ATGACCTTGGACACCAGCACCTCCACCTCCTACATGGA ATTGAGCAGCCTGCGGTCCGAAGATACAGCCGTGTACT ATTGTAAGTGGACTCCTACTACTACTCATCCTCGCTCG ACTACTGGGGCCAGGGTACCCTCGTGACCGTTAGCTCG GCCTCTACTAAGGGTCCGTCCGTGTTCCCGTTGGCCCCG AGCTCGAAGTCCACCTCCGGGGGAACCGCTGCGCTTGG ATGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACGG TGTCCCTGGAACCTCCGGGGCCCTGACCTCGGGAGTGAC ACTTCCCTGCGGTGCTGCAGAGCTCAGGACTGTACAG CCTCAGCTCCGTGCTGACCGTGCCTTCGTCCTCGCTGGG</p>

		<p>CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCGA GCAACACCAAGGTCGACAAGAAAGTCGAGCCGAAGTC ATGCGACAAGACTCACACTTGCCCGCCGTGCCCCGCGC CTGAGCTTCTTGGCGGGCCCTCCGTGTTCTGTTTCCGC CAAAGCCCAAGGATACTCTGATGATTTTCGCGGACTCCT GAAGTGACCTGTGTGGTCGTCGATGTGTCCCATGAGGA CCCCGAGGTCAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTCCACAATGCCAAGACGAAGCCGCGGGAAGAACA GTACAACCTCCACTTATCGCGTGGTGTCCGTGCTCACCGT GCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTACAAG TGCAAAGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCAATTGA AAAGACCATCTCAAAGCGAAGGGCCAGCCGCGCGAA CCACAAGTGTACACCCTGCCTCCTTCCCGGGATGAACT GACCAAGAACCAAGTGTCCCTGACTTGCTCGTGAAGG GTTTCTACCCGTCCGACATCGCCGTGGAATGGGAGAGC AACGGACAGCCCGAGAACAATTACAAGACTACCCAC CCGTGCTCGATTTCGGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCCA AGCTGACCGTGGATAAGTCCCGCTGGCAACAGGGAAA CGTGTTCAAGTTGTTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACA ACCACTACACCCAGAAGTCACTGTCCCTGTCTCCGGGA AAATAA</p>
418	кДНК LC PI- 3040-AB	<p>ATGGATATGAGAGTGCCTGCACAACCTTCTTGGATTACT GCTGCTTTGGTTGTCGGGAGCCAGATGCGATATCCAGA TGACCCAGTCCCCGTCGAGCCTGTCAGCTTCCGTGGGC GACCGGGTCACCATTACTTGTTCGCGCCTCGGCCGGTAT TAGCAATGACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGA AGGCCCCCAAGCTCCTCATCTACGCGGCTTCCCGCCTG CAAGACGGCGTGCCGTCAAGGTTCAAGCGTTCCGGGCTC CGGAACTGACTTCACCCTCACTATCTCGTCCCTGCAACC CGAAGATTTTCGCAACCTACTACTGCCAGCAGTCCTATA AGTACCCCTGGACTTTCGGACAAGGCACCAAGCTCGAG ATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCGAGCGTGTTTATCTT CCCGCCATCTGACGAACAGCTGAAGTCCGGGACAGCGT CCGTGGTCTGCCTGCTCAACAACCTTCTACCCCGCGAG GCCAAAGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCGCTGCAGTC</p>

		CGGAAACAGCCAGGAAAGCGTACTGAGCAAGACTCC AAGGACTCCACCTACTCCCTGTCATCCACCCTGACGCT GTCCAAGGCCGACTACGAAAAGCACAAGGTCTACGCCT GCGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCAAGCCCTGTGACC AAGTCGTTCAACCGGGGAGAGTGTTAA
419	кДНК НС PI- 3041-AB	ATGGACTGGACCTGGAGATTTTTATTCGTCGTCGCTGCC GCCACCGGAGTGCAATCACAAGTACAACCTGGTGCAGA GCGGGGCCGAAGTCAAGAAGCCC GGCGCCTCCGTGAA AATCTCGTGCAAAGCCTCGGGTTACACATTCACTGACT ACGCAGTGAACCTGGGTCAGACAGGCACCGGGCCAGGG ACTCGAGTGGATGGGCTGGATCAACACTCAGACTGGGA AGCCACCTATGCTCAGAAGTTCAGGGAAGGTTTACC TTCACCCTCGACACCAGCACCTCCACCTCCTACTTGGAA ATTAGCAGCCTGCGGTCCGAAGATACAGCCGTGTA TTGTACTAGGGACTCCTACTACTACTCATCCTCGCTCGA CTACTGGGGCCAGGGTACCCTCGTGACCGTTAGCTCGG CCTCTACTAAGGGTCCGTCCGTGTTCCCGTTGGCCCCGA GCTCGAAGTCCACCTCCGGGGGAACCGCTGCGCTTGGA TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACGGT GTCCTGGAACCTCCGGGGCCCTGACCTCGGGAGTGCACA CTTCCCTGCGGTGCTGCAGAGCTCAGGACTGTACAGC CTCAGCTCCGTGCTGACCGTGCCTTCGTCTCCTCGCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCGAG CAACACCAAGGTCGACAAGAAAGTCGAGCCGAAGTCA TGCGACAAGACTCACACTTGCCCCGCCGTGCCCGCGCC TGAGCTTCTTGGCGGGCCCTCCGTGTTCCCTGTTTCCGCC AAAGCCCAAGGATACTCTGATGATTTGCGGACTCCTG AAGTGACCTGTGTGGTTCGTCGATGTGTCCCATGAGGAC CCCGAGGTCAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTCCACAATGCCAAGACGAAGCCGCGGGAAGAACAG TACAACTCCACTTATCGCGTGGTGTCCGTGCTCACCGTG CTGCATCAGGACTGGCTGAACGGAAAGGAGTACAAGT GCAAAGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCAATTGAA AAGACCATCTCAAAGCGAAGGGCCAGCCGCGCGAAC CACAAGTGTACACCCTGCCTCCTTCCCGGGATGAACTG

		<p>ACCAAGAACCAAGTGTCCCTGACTTGCCTCGTGAAGGG TTTCTACCCGTCCGACATCGCCGTGGAATGGGAGAGCA ACGGACAGCCCCGAGAACAATTACAAGACTACCCACCC GTGCTCGATTCCGGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCCAAG CTGACCGTGGATAAGTCCCGCTGGCAACAGGGAAACGT GTTCAAGTTGTTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGTCACTGTCCCTGTCTCCGGGAAAA TAA</p>
420	кДНК LC PI- 3041-AB	<p>ATGGATATGAGAGTGCCTGCACA ACTTCTTGGATTACT GCTGCTTTGGTTGTCTGGGAGCCAGATGCGATATCCAGA TGACCCAGTCCCCGTGAGCCTGTCAGCTTCCGTGGGC GACCGGGTCACCATTACTTGTCTGCGCCTCGGCCGGTAT TAGCAATGACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGA AGGCCCCAAGCTCCTCATCTACGCGGCTTCCCGCCTG CAAGACGGCGTGCCGTCAAGGTTCAAGCGTTCCGGGCTC CGGAACTGACTTCACCCTCACTATCTCGTCCCTGCAACC CGAAGATTTGCAACCTACTACTGCCAGCAGTCCTATA AGTACCCCTGGACTTTCGGACAAGGCACCAAGCTCGAG ATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCGAGCGTGTTTATCTT CCCGCCATCTGACGAACAGCTGAAGTCCGGGACAGCGT CCGTGGTCTGCCTGCTCAACA ACTTCTACCCCCGCGAG GCCAAAGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCGCTGCAGTC CGGAAACAGCCAGGAAAGCGTGACTGAGCAAGACTCC AAGGACTCCACCTACTCCCTGTCATCCACCCTGACGCT GTCCAAGGCCGACTACGAAAAGCACAAGGTCTACGCCT GCGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCAAGCCCTGTGACC AAGTCGTTCAACCGGGGAGAGTGTTAA</p>
421	кДНК HC PI- 3028-AB	<p>ATGGATTGGACTTGGAGATTTTTGTTTGTGGTGGCGGC GGCCACTGGAGTGCAATCCGAAGTGAATTGGTGGAAAT CGGGTGGTGGACTTGTGCAGCCTGGATCGTCACTTAAG CTGTCTGTGTGGCCTCGAAGTTTACCTTCTCCA ACTAT GGGATGAACTGGATTAGACAAGCCCCGAAGAAGGGAC TGGAATGGATTGCGCTGATCTATTACA ACTCGAACAAC AAGTACTACGCTGATTCCGTGAAGGGTCGCTTCACTAT TTCCCGCGACA ACTCGAAGA AACTCTGTACCTTGAGA</p>

		<p>TGAACTCCCTGCGCTCGGAAGATACTGCCATGTACTAC TGTGCCAAGTCGCTGACTGGCGGATCCGATTACTTCGA TTCCTGGGGACAAGGAGTGATGGTCACTGTATCCAGTG CCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA GCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC TTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCAC CTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCC CAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCAGCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGC TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGT AAATAG</p>
422	кДНК LC PI- 3028-AB	<p>ATGGACATGCGCGTGCCTGCGCAATTGCTGGGGCTGCT TCTCCTGTGGCTTTCGGGAGCCCGCTGCGACGTGCAGA TGACCCAGTCCCCTTCTACCTGGCTGCGTCACCGGGA GAATCAGTGTCCATCAGCTGCAAGGCCTCCAAGTCCAT TGGTACCTTCTGGCCTGGTACCAAGAGAAGCCTGAAA</p>

		<p>AGACCAACAAGCTCCTGATCTACTCGGGATCAACCCTG CAATCCGGCACTCCGTCGCGGTTCTCCGGATCCGGGTC CGGCACCGACTTTACTCTGACCATTTCGGAACCTGGAAC CCGAAGATTTGCGCGTGTACTACTGTGTCAGCAGCACGAC GAATACCCGTTTACTTTTCGGCTCCGGCACCAAGCTCGA AATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCT CTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCT GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA</p>
423	кДНК HC PI- 3029-AB	<p>ATGGATTGGACTTGGAGATTTTTGTTTGTGGTGGCGGC GGCCACTGGAGTGCAATCCGAAGTGCAATTGGTGGAAAT CGGGTGGTGGACTTGTGCAGCCTGGATCGTCACTTAAG CTGTCCTGTGTGGCCTCGAAGTTTACCTTCTCCAACAT GGGATGAACTGGATTAGACAAGCCCCGAAGAAGGGAC TGGAATGGATTGCGCTGATCTATTACAACCTCGAACAAC AAGTACTACGCTGATTCCGTGAAGGGTCGCTTCACTAT TTCCCGCGACAACCTCGAAGAACACTCTGTACCTTGAGA TGAACCTCCCTGCGCTCGGAAGATACTGCCATGTACTAC TGTGCCAAGTCGCTGACTGGCGGATCCGATTACTTCGA TTCCCTGGGGACAAGGAGTGATGGTCACTGTATCCAGTG CCAGCACAAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCC TGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCA GCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAATA TGGTCCCCCATGCCATCCTGCCAGCACCTGAGTTCCT GGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAACCCA</p>

		<p>AGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACG TGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGG TCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCAGCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGG TGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA CCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAGGCTAA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATAG</p>
424	кДНК LC PI- 3029-AB	<p>ATGGACATGCGCGTGCCTGCGCAATTGCTGGGGCTGCT TCTCCTGTGGCTTTCGGGAGCCCGCTGCGACGTGCAGA TGACCCAGTCCCCTTCCTACCTGGCTGCGTCACCGGGA GAATCAGTGTCCATCAGCTGCAAGGCCTCCAAGTCCAT TGGTACCTTCCTGGCCTGGTACCAAGAGAAGCCTGAAA AGACCAACAAGCTCCTGATCTACTCGGGATCAACCCTG CAATCCGGCACTCCGTCGCGGTTCTCCGGATCCGGGTC CGGCACCGACTTTACTCTGACCATTCCGGAACCTGGAAC CCGAAGATTTGCGCGTGTACTACTGTGTCAGCAGCACGAC GAATACCCGTTTACTTTCGGCTCCGGCACCAAGCTCGA AATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCT CTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCT GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAC AAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA</p>

425	кДНК НС PI- 3031-AB	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTTTGTGGTGGCGGCG GCTACTGGAGTGCAGTCACAAGTCAACCTTCTGCAATC CCGGGCAGCACTCGTGAAGCCCGGTGCTTCAGTGAAGC TGAGCTGCAAGGCCTCCGGGTACACCTTCACCGACTAC TATCTGCATTGGGTCAAGCAGTCCCACGCCAAGAGCCT GGAGTGGATTGGCTACATCAACCCGAACAACGCCTACA CCTCGTACAATGAGAAGTTCAAGTCCAAAGCGACCCTG ACCGTGGATAAGTCCACTAACACCGCCTACATGGA ACTGTCCAGACTCACGTCCGCCGACTCGGCCACCTATTACT GTGCCCCGGGACACCACAGACTACTACAACCTCCACTTC GCCTACTGGGGCCAGGGA ACTCTGGTCACCGTGTGCGAG CGCCAGCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTGCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA TCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCAGC ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCAC CGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCAGCAACAAGCCCTCCAGCCCCC ATC GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
-----	------------------------	--

		AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAATAG
426	кДНК LC PI- 3031-AB	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTT GCTGCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATTCAA TGACCCAGTCCCCTGCATCACTGAGCGCCTCACTGGGG GAAACTGTCAGCATTGAGTGCCTGACCTCCGAGGGAAT CTCGAACGACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGTCCGGAA AGTCGCCGCAGCTGCTTATCTACGACGCCAGCAGACTC GAGGACGGCGTGCCCTCCCGCTTTTCCGGCTCTGGTTCC GGCACTCGGTACAGCCTGAAGATCTCCGGAATGCAGAC CGAAGATGAAGCTGACTACTTCTGCCAACAATCGTACA AATACCCACTGACCTTCGGTTCCGGGACCAAGCTCGAA ATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTC TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG CCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTG AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA
427	Последователь ность сигнального пептида HC	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCG GCTACTGGAGTGCAGTCA
428	Последователь ность сигнального пептида HC	MDWTWRFLFVVAATGVQS
429	Последователь ность сигнального пептида LC	MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARC
430	Последователь	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTT

	нось сигнального пептида LC	GCTGCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGT
431	L1 CDR	ASEGISNDLA
432	L1 CDR	ASAGISNDLA
433	L1 CDR	ASKSIGTFLA
434	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3025- AB2	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLTVTV SS
435	CDR-H1 PI- 3025-AB2	GFSLTSYHVS
436	CDR-H2 PI- 3025-AB2	AIWTGGSIA
437	CDR-H3 PI- 3025-AB2	DLSDYYSSYTSFDY
438	Тяжелая цепь PI-3025-AB2	EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
439	Вариабельный домен легкой цепи PI-3025- AB2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQK PKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCQQSYKYPLTFGQGTKLEIK
440	CDR-L1 PI-	RASEGISNDLA

	3025-AB2		
441	CDR-L2 3025-AB2	PI-	AASRLQD
442	CDR-L3 3025-AB2	PI-	QQSYKYPLT
443	Легкая цепь 3025-AB	PI-	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCQQSYKYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
444	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3048- AB		EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLTVT SS
445	CDR-H1 3048-AB	PI-	GFSLTSYHVS
446	CDR-H2 3048-AB	PI-	AIWTGGZIA
447	CDR-H3 3048-AB	PI-	DLSDYYSSYTSFDY
448	Тяжелая цепь PI-3048-AB		EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLTVT SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK

449	Вариабельный домен легкой цепи PI-3048-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCQQSYKYPLTFGQGTKLEIK
450	CDR-L1 PI-3048-AB	RASEGISNDLA
451	CDR-L2 PI-3048-AB	AASRLQD
452	CDR-L3 PI-3048-AB	QQSYKYPLT
453	Легкая цепь PI-3048-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPE DFATYYCQQSYKYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVCLLNFPYFVPEAKVKVQWVKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
454	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3041-AB	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYAVNWVR QAPGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRFTFTLDTSTS TSYLEISSLRSEDTAVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGLVT VSS
455	CDR-H1 PI-3041-AB	GYTFTDYAVN
456	CDR-H2 PI-3041-AB	WINTQTGKPT
457	CDR-H3 PI-3041-AB	DSYYYSSSLDY
458	Тяжелая цепь PI-3041-AB	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYAVNWVR QAPGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRFTFTLDTSTS TSYLEISSLRSEDTAVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

		WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
459	Вариабельный домен легкой цепи PI-3041-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKPGKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFGSGSGTDFTLTISSMQPEDFATYYCQQSYKYPWTFGQGTKLEIK
460	CDR-L1 PI-3041-AB	RASAGISNDLA
461	CDR-L2 PI-3041-AB	AASRLQD
462	CDR-L3 PI-3041-AB	QQSYKYPWT
463	Легкая цепь PI-3041-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKPGKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFGSGSGTDFTLTISSMQPEDFATYYCQQSYKYPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
464	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3047-AB	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYAVNWVRQAPGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRFTFTLDTSTSTSYLEISSLRSEDVAVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGLVTVSS
465	CDR-H1 PI-3047-AB	GYTFTDYAVN
466	CDR-H2 PI-3047-AB	WINTQTGKPT
467	CDR-H3 PI-3047-AB	DSYYYSSSLDY
468	Тяжелая цепь PI-3047-AB	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYAVNWVRQAPGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRFTFTLDTSTSTSYLEISSLRSEDVAVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT

		VSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNNH YTQKSLSLSLGK
469	Вариабельный домен легкой цепи PI-3047- AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISMQPE DFATYYCQQSYKYPWTFGQGTKLEIK
470	CDR-L1 PI- 3047-AB	RASAGISNDLA
471	CDR-L2 PI- 3047-AB	AASRLQD
472	CDR-L3 PI- 3047-AB	QQSYKYPWT
473	Легкая цепь PI- 3047-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISMQPE DFATYYCQQSYKYPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
474	Вариабельный домен тяжелой цепи PI-3046- AB	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWMGAIWTGGSIAYNPSLKSRLTISRDTSKNQVSL KMSSLTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLV TVSS
475	CDR-H1 PI- 3046-AB	GFSLTSYHVS
476	CDR-H2 PI- 3046-AB	AIWTGGSIA
477	CDR-H3 PI- 3046-AB	DLSDYYSSYTSFDY

478	Тяжелая цепь PI-3046-AB	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQP PGKGLEWMGAIWTGGSIAYNPSLKSRLTISRDTSKNQVSL KMSSLTAADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLYSRLLTVDKSRWQEGNVSFSCSMHEALHN HYTQKSLSLSLGK
479	Вариабельный домен легкой цепи PI-3046- AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPE DFATYYCQQSYKYPLTFGQGTKLEIK
480	CDR-L1 PI- 3046-AB	RASEGISNDLA
481	CDR-L2 PI- 3046-AB	AASRLQD
482	CDR-L3 PI- 3046-AB	QQSYKYPLT
483	Легкая цепь PI- 3046-AB	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKP GKAPKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPE DFATYYCQQSYKYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с богатым цистеином доменом рецептора-мусорщика (SRCR) (остатки 424-519 SEQ ID NO: 384) из человеческого рецептора макрофагов с коллагеновой структурой (MARCO) (SEQ ID NO: 384).

2. Выделенное антитело по п. 1, причем антитело содержит последовательность варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и последовательность варибельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где:

CDR-H1 включает последовательность GFSLTSYHVS (SEQ ID NO: 2),

CDR-H2 включает последовательность AIWTGGSIA (SEQ ID NO: 3),

CDR-H3 включает последовательность DLSDYYSSYTSFDY (SEQ ID NO: 4),

CDR-L1 включает последовательность ASEGISNDLA (SEQ ID NO: 431) или XASEGISNDLA (SEQ ID NO: 383), где X представляет собой аргинин (R) или лейцин (L),

CDR-L2 включает последовательность AASRLQD (SEQ ID NO: 8), и

CDR-L3 включает последовательность QQSYKYPLT (SEQ ID NO: 9).

3. Выделенное антитело по п. 1 или п. 2, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с одним из следующих остатков: Q452, Y472, K473, E450, Q487, T499, H505, D507, S509 или E511 из MARCO (SEQ ID NO: 384).

4. Выделенное антитело по любому из пп. 1-3, причем антитело или антигенсвязывающий фрагмент включают химерное, человеческое, гуманизованное или крысиное антитело, или антигенсвязывающий фрагмент.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MARCO человека (SEQ ID NO: 384), содержащие последовательность варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и последовательность варибельной области легкой цепи (VL), включающую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где:

CDR-H1 включает последовательность GFSLTSYHVS (SEQ ID NO: 2),

CDR-H2 включает последовательность AIWTGGSIA (SEQ ID NO: 3),

CDR-H3 включает последовательность DLSDYYSSYTSFDY (SEQ ID NO: 4),

CDR-L1 включает последовательность ASEGISNDLA (SEQ ID NO: 431) или XASEGISNDLA (SEQ ID NO: 383), где X представляет собой аргинин (R) или лейцин (L),

CDR-L2 включает последовательность AASRLQD (SEQ ID NO: 8), и

CDR-L3 включает последовательность QQSYKYPLT (SEQ ID NO: 9).

6. Выделенное антитело по п. 5, причем CDR-L1 включает последовательность ASEGISNDLA (SEQ ID NO: 431).

7. Выделенное антитело по п. 5, причем: CDR-L1 включает последовательность RASEGISNDLA (SEQ ID NO: 27).

8. Выделенное антитело по п. 5, причем: CDR-L1 включает последовательность LASEGISNDLA (SEQ ID NO: 7).

9. Выделенное антитело по любому из пп. 5-7, причем последовательность VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 61.

10. Выделенное антитело по любому из пп. 5-7, причем последовательность VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 111.

11. Выделенное антитело по любому из пп. 5-8, причем последовательность VH включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 434, 444 и 474.

12. Выделенное антитело по любому из пп. 5-11, причем последовательность VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 66.

13. Выделенное антитело по любому из пп. 5-11, причем последовательность VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 116.

14. Выделенное антитело по любому из пп. 5-11, причем последовательность VL включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 57, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 439, 449 и 479.

15. Выделенное антитело по любому из пп. 5-14, причем последовательность VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 61; и последовательность VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 66.

16. Выделенное антитело по любому из пп. 5-14, причем последовательность VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 111; и последовательность VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 116.

17. Выделенное антитело по любому из пп. 5-14, причем последовательность VH включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 434, 444 и 474, и последовательность VL включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 57, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 439, 449 и 479.

18. Выделенное антитело по любому из пп. 5-14, причем последовательность VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 434, 444 и 474, и/или последовательность VL включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 57, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 439, 449 и 479.

19. Выделенное антитело по любому из пп. 5-18, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 65.

20. Выделенное антитело по любому из пп. 5-18, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 115.

21. Выделенное антитело по любому из пп. 5-20, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 5, 15, 125, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 145, 438, 448 и 478.

22. Выделенное антитело по любому из пп. 5-21, причем антитело содержит последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 70.

23. Выделенное антитело по любому из пп. 5-21, причем антитело содержит последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 120.

24. Выделенное антитело по любому из пп. 5-23, причем антитело содержит последовательность легкой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 6, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 443, 453 и 483.

25. Выделенное антитело по любому из пп. 5-24, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 65, и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 70.

26. Выделенное антитело по любому из пп. 5-24, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 115; и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 120.

27. Выделенное антитело по любому из пп. 5-24, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 5, 15, 125, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 145, 438, 448 и 478, и последовательность легкой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 6, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 443, 453 и 483.

28. Выделенное антитело по любому из пп. 5-24, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 5, 15, 125, 35, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 105, 115, 125, 145, 438, 448 и 478; и/или последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50, 6, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 443, 453 и 483.

29. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MARCO человека (SEQ ID NO: 384), содержащие последовательность варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и последовательность варибельной области легкой цепи (VL), включающую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где:

CDR-H1 включает последовательность GYTFTDYAVN (SEQ ID NO: 232),

CDR-H2 включает последовательность WINTQTGKPT (SEQ ID NO: 233),

CDR-H3 включает последовательность DSYYYSSSLDY (SEQ ID NO: 234),

CDR-L1 включает последовательность ASAGISNDLA (SEQ ID NO: 432) или XASAGISNDLA (SEQ ID NO: 381), где X представляет собой аргинин (R) или лейцин (L),
CDR-L2 включает последовательность AASRLQD (SEQ ID NO: 238), и
CDR-L3 включает последовательность QQSYKYPWT (SEQ ID NO: 239).

30. Выделенное антитело по п. 29, причем: CDR-L1 включает последовательность ASAGISNDLA (SEQ ID NO: 432).

31. Выделенное антитело по п. 29, причем: CDR-L1 включает последовательность RASAGISNDLA (SEQ ID NO: 317).

32. Выделенное антитело по п. 29, причем: CDR-L1 включает последовательность LASAGISNDLA (SEQ ID NO: 237).

33. Выделенное антитело по любому из пп. 29-32, причем последовательность VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 454.

34. Выделенное антитело по любому из пп. 29-32, причем последовательность VH включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 241, 311, 321, 331, 341, 351, 454 и 464.

35. Выделенное антитело по любому из пп. 29-34, причем последовательность VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 459.

36. Выделенное антитело по любому из пп. 29-34, причем последовательность VL включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 246, 316, 326, 336, 346, 356, 459 и 469.

37. Выделенное антитело по любому из пп. 29-36, причем последовательность VH включает последовательность VH, указанную в SEQ ID NO: 454; и последовательность VL включает последовательность VL, указанную в SEQ ID NO: 459.

38. Выделенное антитело по любому из пп. 29-36, причем последовательность VH включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 241, 311, 321, 331, 341, 351, 454 и 464, и последовательность VL включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 246, 316, 326, 336, 346, 356, 459 и 469.

39. Выделенное антитело по любому из пп. 29-36, причем последовательность VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 241, 311, 321, 331, 341, 351, 454 и 464; и/или последовательность VL включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 246, 316, 326, 336, 346, 356, 459 и 469.

40. Выделенное антитело по любому из пп. 29-38, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 458.

41. Выделенное антитело по любому из пп. 29-38, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 245, 315, 325, 335, 345, 355, 458 и 468.

42. Выделенное антитело по любому из пп. 29-41, причем антитело содержит последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 463.

43. Выделенное антитело по любому из пп. 29-41, причем антитело содержит последовательность легкой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 250, 320, 330, 340, 350, 360, 463 и 473.

44. Выделенное антитело по любому из пп. 29-43, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 458; и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 463.

45. Выделенное антитело по любому из пп. 29-43, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 245, 315, 325, 335, 345, 355, 458 и 468; и последовательность легкой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 250, 320, 330, 340, 350, 360, 463 и 473.

46. Выделенное антитело по любому из пп. 29-43, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 245, 315, 325, 335, 345, 355, 458 и 468; и/или последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 250, 320, 330, 340, 350, 360, 463 и 473.

47. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MARCO человека (SEQ ID NO: 384), содержащие последовательность варибельной области тяжелой цепи (VH), включающую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и последовательность варибельной области легкой цепи (VL), включающую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где:

CDR-H1 включает последовательность KFTFSNYGMN (SEQ ID NO: 142),

CDR-H2 включает последовательность LIYYNSNNKY (SEQ ID NO: 143),

CDR-H3 включает последовательность SLTGGSDYFDS (SEQ ID NO: 144),

CDR-L1 включает последовательность ASKSIGTFLA (SEQ ID NO: 433) или XASKSIGTFLA (SEQ ID NO: 382), где X представляет собой аргинин (R) или лизин (K),

CDR-L2 включает последовательность SGSTLQS (SEQ ID NO: 148), и

CDR-L3 включает последовательность QQHDEYPFT (SEQ ID NO: 149).

48. Выделенное антитело по п. 47, причем: CDR-L1 включает последовательность ASKSIGTFLA (SEQ ID NO: 433).

49. Выделенное антитело по п. 47, причем: CDR-L1 включает последовательность KASKSIGTFLA (SEQ ID NO: 147).

50. Выделенное антитело по п. 47, причем: CDR-L1 включает последовательность RASKSIGTFLA (SEQ ID NO: 157).

51. Выделенное антители по любому из пп. 47-50, причем последовательность VH включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211 и 221.

52. Выделенное антители по любому из пп. 47-51, причем последовательность VL включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216 и 226.

53. Выделенное антители по любому из пп. 47-52, причем последовательность VH включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211 и 221, и последовательность VL включает последовательность, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216 и 226.

54. Выделенное антители по любому из пп. 47-52, причем последовательность VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 141, 151, 161, 171, 181, 191, 201, 211 и 221, и/или последовательность VL включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 146, 156, 166, 176, 186, 196, 206, 216 и 226.

55. Выделенное антители по любому из пп. 47-54, причем антители содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 145, 155, 165, 175, 185, 195, 205, 215 и 225.

56. Выделенное антители по любому из пп. 47-55, причем антители содержит последовательность легкой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220 и 230.

57. Выделенное антители по любому из пп. 47-56, причем антители содержит последовательность тяжелой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 145, 155, 165, 175, 185, 195, 205, 215 и 225, и последовательность легкой цепи, выбранную из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220 и 230.

58. Выделенное антители по любому из пп. 47-54, причем антители содержит последовательность тяжелой цепи, включающую последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 145, 155, 165, 175, 185, 195, 205, 215 и 225, и/или последовательность легкой цепи, включающую последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, выбранной из последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220 и 230.

59. Выделенное антители или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MARCO человека (SEQ ID NO: 384), содержащие последовательность варибельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR

тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где:

CDR-H1 включает последовательность GYTFTDYLLH (SEQ ID NO: 252),
CDR-H2 включает последовательность YINPNNAYTS (SEQ ID NO: 253),
CDR-H3 включает последовательность DTTDYNNLHFAY (SEQ ID NO: 254),
CDR-L1 включает последовательность LTSEGISNDLA (SEQ ID NO: 257),
CDR-L2 включает последовательность DASRLED (SEQ ID NO: 258), и
CDR-L3 включает последовательность QQSYKYPLT (SEQ ID NO: 259).

60. Выделенное антитело по п. 59, причем последовательность VH включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 251 или 261.

61. Выделенное антитело по п. 59 или п. 60, причем последовательность VL включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 256 или 266.

62. Выделенное антитело по любому из пп. 59-61, причем последовательность VH включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 251 или 261, а последовательность VL включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 256 или 266.

63. Выделенное антитело по любому из пп. 59-61, причем последовательность VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98 или 99% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 251 или 261, и/или последовательность VL включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98 или 99% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 256 или 266.

64. Выделенное антитело по любому из пп. 59-62, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 255 или 265.

65. Выделенное антитело по любому из пп. 59-64, причем антитело содержит последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 260 или 270.

66. Выделенное антитело по любому из пп. 59-65, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 255 или 265; и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 260 или 270.

67. Выделенное антитело по любому из пп. 59-65, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, включающую последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 255 или 265; и последовательность легкой цепи, включающую последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 260 или 270.

68. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с MARCO человека (SEQ ID NO: 384), содержащие последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), содержащую три последовательности CDR тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и последовательность вариабельной области

легкой цепи (VL), содержащую три последовательности CDR легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где:

CDR-H1 включает последовательность GFSLTSYTLS (SEQ ID NO: 362),
CDR-H2 включает последовательность AIWGGDNTD (SEQ ID NO: 363),
CDR-H3 включает последовательность ELGGSFDY (SEQ ID NO: 364),
CDR-L1 включает последовательность KTSQNINKKLD (SEQ ID NO: 367),
CDR-L2 включает последовательность YTNNLQT (SEQ ID NO: 368), и
CDR-L3 включает последовательность YQYDSGFT (SEQ ID NO: 369).

69. Выделенное антитело по п. 68, причем последовательность VH включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 361 или 371.

70. Выделенное антитело по п. 68 или п. 69, причем последовательность VL включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 366 или 376.

71. Выделенное антитело по любому из пп. 68-70, причем последовательность VH включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 361 или 371, и последовательность VL включает последовательность, указанную в SEQ ID NO: 366 или 376.

72. Выделенное антитело по любому из пп. 68-70, причем последовательность VH включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98 или 99% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 361 или 371, и/или последовательность VL включает последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98 или 99% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 366 или 376.

73. Выделенное антитело по любому из пп. 68-72, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 365 или 375; и последовательность легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 370 или 380.

74. Выделенное антитело по любому из пп. 68-72, причем антитело содержит последовательность тяжелой цепи, включающую последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 365 или 375; и последовательность легкой цепи, включающую последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 370 или 380.

75. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело представляет собой моноклональное антитело, нейтральное антитело, антагонистическое антитело, агонистическое антитело, поликлональное антитело, афукозилированное антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, полноразмерное антитело и scFv.

76. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело представляет собой scFv.

77. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело представляет собой моноклональное антитело.

78. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело представляет собой гуманизированное антитело.

79. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело представляет собой человеческое антитело.

80. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело содержит область Fc.

81. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем область Fc включает область Fc человека.

82. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело содержит активную область Fc человека.

83. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело содержит человеческую константную область тяжелой цепи класса, выбранного из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM.

84. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело содержит константную область тяжелой цепи человека класса IgG и подкласса, выбранного из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

85. Выделенное антитело по п. 84, причем область Fc человека содержит область Fc человеческого IgG1 дикого типа.

86. Выделенное антитело по п. 84, причем область Fc человека включает область Fc человеческого IgG4 дикого типа.

87. Выделенное антитело по любому из пп. 80-86, причем область Fc содержит одну или более аминокислотных замен, при этом одна или более замен приводят к увеличению времени полужизни антитела, повышению активности АЗКЦ, повышению активности АЗКФ, повышению активности КЗЦ, снижению активности АЗКЦ, снижению активности АЗКФ или снижению активности КЗЦ по сравнению с областью Fc без одной или более замен.

88. Выделенное антитело по любому из пп. 80-84, причем область Fc связывает Fcγ-рецептор, выбранный из группы, состоящей из: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa и FcγRIIIb.

89. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело связывается с MARCO человека с K_D менее или равной около 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7×10^{-9} М по данным анализа методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR - англ.: surface plasmon resonance).

90. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем связывание антитела с MARCO человека зависит от двухвалентного катиона.

91. Выделенное антитело по любому из пп. 1-89, причем связывание антитела с MARCO человека не зависит от двухвалентного катиона.

92. Выделенное антитело по п. 90 или п. 91, причем двухвалентный катион включает Ca^{2+} или Mg^{2+} .

93. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело связывается с внеклеточным доменом MARCO человека.

94. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело связывается с растворимым MARCO.

95. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело связывается с доменом SRCR MARCO человека, MARCO яванского макака или MARCO человека и яванского макака.

96. Выделенное антитело по п. 95, причем антитело связывается с доменом SRCR (остатки 424-519 SEQ ID NO: 384) MARCO человека.

97. Выделенное антитело по п. 96, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются по меньшей мере с одним из: Q452, Y472, K473, E450, Q487, T499, H505, D507, S509 или E511 из MARCO (SEQ ID NO: 384).

98. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело обладает активностью, блокирующей рецептор-лиганд.

99. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело индуцирует повышенную экспрессию по меньшей мере одного цитокина или хемокина при контакте с клетками по сравнению с изотипическим контрольным антителом, необязательно измеренную с помощью анализа нуклеиновой кислоты или белка.

100. Выделенное антитело по п. 99, причем по меньшей мере один цитокин или хемокин включают по меньшей мере один из IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL7R, IL-12, IL12-p70, IL-15, IL-18, IL-27, IP-10, IFN- γ , TNF α , MIP1- α , MIP1- β , MIP-2, CSF2, CSF3, G-CSF, M-CSF, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CCL24, CXCL1, CXCL3, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, GRO-альфа, MCP-1, MCP-3, LIF или эотаксина.

101. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем при контакте с клетками антитело индуцирует повышенную активацию НК-клеток, регуляцию В-клеток, пролиферацию Т-клеток, активацию Т-клеток или дифференцировку Т-клеток по сравнению с изотипическим контрольным антителом, необязательно измеренную с помощью анализа нуклеиновой кислоты или белка.

102. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем при контакте с клетками антитело индуцирует сигналинг IL-2-STAT5, сигналинг NF-kB, сигналинг TLR, сигналинг адгезии и подвижности, сигналинг перестройки цитоскелета, сигналинг TNF α через NF-kB, сигналинг IL-6-JAK-STAT3, сигналинг SYK, сигналинг MAPK, сигналинг TPL2, кальциевый сигналинг, ответ IFN γ или ответ IFN α по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

103. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем при контакте с клетками антитело подавляет путь клеточного цикла, выживаемость клеток, клеточную адгезию, путь мишени Мус, путь мишеней E2F, гипоксию, сигнальный путь mTOR, сигнальный путь PI3K-AKT, сигнальный путь Src, сигнальный путь PKC, сигнальный путь эпителиально-мезенхимального перехода, окислительное

фосфорилирование или сигнальный путь MAPK по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

104. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем при контакте с клетками антитело индуцирует активацию инфламмасом, что определяется секрецией IL-1 β и/или IL-18 и/или фагоцитозом по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

105. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем при контакте с клетками антитело индуцирует реполяризацию миелоидных M2-подобных TAM в M1-подобные ассоциированные с опухолью макрофаги (TAM - англ.: tumor associated macrophage) и/или реполяризацию mMDSC в провоспалительные моноциты по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

106. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем при контакте с клетками антитело увеличивает количество CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, NK-клеток, дендритных клеток, MHCII⁺ макрофагов, MHCII^{high} моноцитов или MHCII^{mid} моноцитов по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

107. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем при контакте с клетками антитело увеличивает количество макрофагов, макрофагов маргинальной зоны, фолликулярных В-клеток и/или макрофагов красной пульпы в селезенке по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

108. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем при контакте с клетками антитело снижает количество TAM, ассоциированных с опухолью нейтрофилов (TAN - англ.: tumor associated neutrophil), В-клеток плазмы, В-клеток маргинальной зоны, CD19⁺ В-клеток, MHCII⁻ моноцитов и/или MHCII⁻ макрофагов по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

109. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем при введении субъекту антитело индуцирует повышенный противоопухолевый вторичный ответ по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

110. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем клетка представляет собой MARCO⁺ клетку.

111. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем клетка представляет собой человеческую MARCO⁺ клетку.

112. Выделенное антитело по п. 110 или п. 111, причем MARCO⁺клетка представляет собой моноцит, моноцитарную клетку-супрессор миелоидного происхождения (mMDSC - англ.: monocytic Myeloid Derived Suppressor Cell) или макрофаг.

113. Выделенное антитело по п. 112, причем макрофаг представляет собой ассоциированный с опухолью макрофаг (TAM) или моноцитарный макрофаг (MDM - англ.: monocyte-derived macrophage).

114. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело связывается с MARCO на поверхности MARCO⁺ клетки.

115. Выделенное антитело по любому из вышеуказанных пунктов, причем антитело:

конкурирует за связывание с MARCO человека с гуманизированным антителом PI-NX-3011, PI-NX-3031, PI-NX-3043, PI-NX-3061, PI-NX-3092;

связывается с MARCO человека;

связывается с MARCO яванского макака;

связывается с MARCO человека и яванского макака;

связывается с доменом SRCR MARCO человека;

связывается с доменом SRCR MARCO яванского макака;

связывается с доменом SRCR MARCO человека и яванского макака;

связывается с MARCO человека или яванского макака зависимым от двухвалентного катиона образом;

связывается с MARCO человека или яванского макака независимым от двухвалентного катиона образом;

стимулирует сигналинг MARCO при связывании с MARCO+ клеткой;

индуцирует один или более иммунных сигнальных путей при связывании с MARCO+ клеткой;

индуцирует секрецию цитокина или хемокина при связывании с MARCO+ клеткой, необязательно при этом цитокин или хемокин представляет собой IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL7R, IL-12, IL12-p70, IL-15, IL-18, IL-27, IP-10, IFN- γ , TNF α , MIP1- α , MIP1- β , MIP-2, CSF2, CSF3, G-CSF, M-CSF, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CCL24, CXCL1, CXCL3, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, GRO-альфа, MCP-1, MCP-3, LIF или эотаксин;

индуцирует повышенную активацию NK-клеток, регуляцию В-клеток, пролиферацию Т-клеток, активацию Т-клеток или дифференцировку Т-клеток при связывании с MARCO+ клеткой;

индуцирует сигналинг IL-2-STAT5, сигналинг NF- κ B, сигналинг TLR, сигналинг адгезии и подвижности, сигналинг перестройки цитоскелета, сигналинг TNF α через NF- κ B, сигналинг IL-6-JAK-STAT3, сигналинг SYK, сигналинг MAPK, сигналинг TPL2, кальциевый сигналинг, ответ IFN γ или ответ IFN α ;

подавляет путь клеточного цикла, выживаемость клеток, клеточную адгезию, путь мишени Мус, путь мишеней E2F, гипоксию, сигнальный путь mTOR, сигнальный путь PI3K-AKT, сигнальный путь Src, сигнальный путь PKC, сигнальный путь эпителиально-мезенхимального перехода, окислительное фосфорилирование или сигнальный путь MAPK;

индуцирует активацию инфламмасом, что определяется секрецией IL-1 β и/или IL-18, и/или фагоцитозом;

индуцирует реполяризацию миелоидных M2-подобных TAM в M1-подобные TAM и/или реполяризацию mMDSC в провоспалительные моноциты;

модулирует В-клетки в селезенке при связывании с MARCO+ клеткой;

увеличивает количество CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, NK-клеток, дендритных клеток, MHCII⁺ макрофагов, MHCII^{high} моноцитов и/или MHCII^{mid} моноцитов в селезенке и/или опухоли;

увеличивает количество макрофагов, макрофагов маргинальной зоны, фолликулярных В-клеток и/или макрофагов красной пульпы в селезенке и/или опухоли;

снижает количество TAM, ассоциированных с опухолью нейтрофилов, В-клеток плазмы, В-клеток маргинальной зоны, CD19⁺ В-клеток, MHCII⁻ моноцитов и/или MHCII⁻ макрофагов в селезенке и/или опухоли;

индуцирует изменения в клеточной адгезии, цитоскелете, хемотаксисе и миграции клеток при связывании с MARCO⁺ клеткой;

индуцирует клеточные сигнальные пути, включающие пути адгезии, миграции, хемотаксиса, клеточного цикла, Т-клеточного рецептора, фагоцитоза, аутофагии и путь wnt при связывании с MARCO⁺ клеткой;

инактивирует MARCO⁺ миелоидные клетки; или
способно к любой комбинации а.- х.

116. Выделенное антитело по любому из приведенных выше пунктов для применения в качестве лекарственного средства.

117. Выделенное антитело по любому из приведенных выше пунктов для применения в лечении рака или инфекции.

118. Выделенное антитело по любому из приведенных выше пунктов для применения в лечении рака, причем рак выбран из солидной опухоли и гемобластоза.

119. Выделенный полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующие антитело по любому из вышеуказанных пунктов, его VH, его VL, его легкую цепь, его тяжелую цепь или его антигенсвязывающую часть; необязательно выделенный полинуклеотид или набор полинуклеотидов представляет собой кДНК.

120. Вектор или набор векторов, содержащий полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п. 119.

121. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п. 119, или вектор, или набор векторов по п. 120.

122. Способ получения антитела, включающий экспрессию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с клеткой-хозяином по п. 121 и выделение экспрессированного антитела.

123. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-118 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

124. Набор, содержащий выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-118 или фармацевтическую композицию по п. 123, и инструкцию по применению.

125. Способ усиления иммунного ответа у субъекта, включающий введение субъекту композиции, содержащей антитело к MARCO человека или его антигенсвязывающий фрагмент.

126. Способ по п. 125, отличающийся тем, что композиция содержит антитело, которое связывается с доменом SRCR (остатки 424-519 SEQ ID NO: 384) MARCO человека.

127. Способ по п. 125 или п. 126, отличающийся тем, что композиция содержит выделенное антитело по любому из пп. 11-118 или фармацевтическая композиция по п. 123.

128. Способ по п. 127, отличающийся тем, что антитело обладает активностью, блокирующей рецептор-лиганд.

129. Способ по любому из пп. 125-128, отличающийся тем, что усиленный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ.

130. Способ по любому из пп. 125-128, отличающийся тем, что усиленный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.

131. Способ по любому из пп. 125-130, отличающийся тем, что повышенный иммунный ответ включает повышенную экспрессию по меньшей мере одного цитокина или хемокина клеткой по сравнению с изотипическим контрольным антителом, необязательно измеренную с помощью анализа нуклеиновой кислоты или белка.

132. Способ по п. 131, отличающийся тем, что по меньшей мере один цитокин или хемокин включают по меньшей мере один из IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL7R, IL-12, IL12-p70, IL-15, IL-18, IL-27, IP-10, IFN- γ , TNF α , MIP1- α , MIP1- β , MIP-2, CSF2, CSF3, G-CSF, M-CSF, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CCL24, CXCL1, CXCL3, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, GRO-альфа, MCP-1, MCP-3, LIF или эотаксина.

133. Способ по любому из пп. 125-129, отличающийся тем, что повышенный иммунный ответ включает повышенную активацию NK-клеток, регуляцию В-клеток, пролиферацию Т-клеток, активацию Т-клеток или дифференцировку Т-клеток по сравнению с изотипическим контрольным антителом, необязательно измеренную с помощью анализа нуклеиновой кислоты или белка.

134. Способ по любому из пп. 125-133, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело индуцирует сигналинг IL-2-STAT5, сигналинг NF-kB, сигналинг TLR, сигналинг адгезии и подвижности, сигналинг перестройки цитоскелета, сигналинг TNF α через NF-kB, сигналинг IL-6-JAK-STAT3, сигналинг SYK, сигналинг MAPK, сигналинг TPL2, кальциевый сигналинг, ответ IFN γ или ответ IFN α по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

135. Способ по любому из пп. 125-134, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело подавляет путь клеточного цикла, выживаемость клеток, клеточную адгезию, путь мишени Мус, путь мишеней E2F, гипоксию, сигнальный путь mTOR, сигнальный путь PI3K-AKT, сигнальный путь Src, сигнальный путь PKC, сигнальный

путь эпителиально-мезенхимального перехода, окислительное фосфорилирование или сигнальный путь MAPK по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

136. Способ по любому из пп. 125-135, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело индуцирует активацию инфламмасом, что определяется секрецией IL-1 β и/или IL-18 и/или фагоцитозом по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

137. Способ по любому из пп. 125-136, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело индуцирует реполяризацию миелоидных M2-подобных TAM в M1-подобные TAM и/или реполяризацию mMDSC в провоспалительные моноциты по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

138. Способ по любому из пп. 125-137, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело увеличивает количество CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, NK-клеток, дендритных клеток, MHCII⁺ макрофагов, MHCII^{high} моноцитов или MHCII^{mid} моноцитов по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

139. Способ по любому из пп. 125-138, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело увеличивает количество макрофагов, макрофагов маргинальной зоны, фолликулярных В-клеток и/или макрофагов красной пульпы в селезенке по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

140. Способ по любому из пп. 125-139, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело снижает количество TAM, ассоциированных с опухолью нейтрофилов, В-клеток плазмы, В-клеток маргинальной зоны, CD19⁺ В-клеток, MHCII⁻ моноцитов и/или MHCII⁻ макрофагов по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

141. Способ по любому из пп. 125-140, отличающийся тем, что антитело индуцирует усиленный вторичный иммунный ответ.

142. Способ по любому из пп. 125-141, отличающийся тем, что клетка представляет собой MARCO⁺ клетку.

143. Способ по любому из пп. 125-142, отличающийся тем, что клетка представляет собой человеческую MARCO⁺ клетку.

144. Способ по п. 142 или п. 143, отличающийся тем, что MARCO⁺ клетки представляют собой моноцит, моноцитарную клетку-супрессор миелоидного происхождения (mMDSC) или макрофаг.

145. Способ по п. 144, отличающийся тем, что макрофаг представляет собой ассоциированный с опухолью макрофаг (TAM) или моноцитарный макрофаг (MDM).

146. Способ по любому из пп. 125-145, отличающийся тем, что антитело связывается с MARCO на поверхности MARCO⁺ клетки.

147. Способ по любому из пп. 125-146, отличающийся тем, что субъект представляет собой человека.

148. Способ по любому из пп. 125-147, отличающийся тем, что у субъекта имеется рак.

149. Способ по п. 148, отличающийся тем, что рак представляет собой солидный рак.

150. Способ по п. 148 или п. 149, отличающийся тем, что рак представляет собой гемобластоз.

151. Способ по любому из пп. 148-150, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из: рака легкого, аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака почки, рака печени, почечно-клеточного рака, рака шейки матки, рака яичников, колоректального рака, рака толстой кишки, нейробластомы, рака молочной железы, трижды негативного рака молочной железы, базальноподобного рака молочной железы, рака желудка, рака желудка, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака кожи, лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL - англ.: Diffuse large B-cell lymphoma), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, неходжкинской лимфомы, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака эндометрия, рака головы и шеи или плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSC - англ.: head and neck squamous carcinoma).

152. Способ по п. 151, отличающийся тем, что рак представляет собой рак толстой кишки, рак молочной железы, базальноподобный рак молочной железы, рак яичников или рак желудка.

153. Способ по любому из пп. 148-152, отличающийся тем, что MARCO экспрессируется на более высоком уровне на иммунной клетке, которая находится в пределах опухоли, по сравнению с иммунной клеткой, которая находится вне опухоли.

154. Способ по любому из пп. 148-153, отличающийся тем, что IL-10 экспрессируется на более высоком уровне на иммунной клетке, которая находится в пределах опухоли, по сравнению с иммунной клеткой, которая находится вне опухоли.

155. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту композиции, содержащей антитело к MARCO человека или его антигенсвязывающий фрагмент.

156. Способ по п. 155, отличающийся тем, что композиция содержит антитело, которое связывается с доменом SRCR (остатки 424-519 SEQ ID NO: 384) MARCO человека.

157. Способ по п. 155 или п. 156, отличающийся тем, что композиция содержит выделенное антитело по любому из пп. 1-118 или включает фармацевтическую композицию по п. 123.

158. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту композиции, содержащей антитело к MARCO человека или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-118, или фармацевтической композиции по п. 123.

159. Способ по любому из пп. 155-158, отличающийся тем, что субъект ранее получал, совместно получает или будет получать иммунотерапию.

160. Способ по п. 159, отличающийся тем, что иммунотерапия включает в себя по меньшей мере одно из следующего: ингибитор контрольной точки; ингибитор контрольной точки Т-клеток; и антитело к PD1.

161. Способ по п. 160, отличающийся тем, что иммунотерапия включает в себя антитело к PD1.

162. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту композиции, содержащей антитело к MARCO человека или его антигенсвязывающий фрагмент, и применение иммунотерапии.

163. Способ по п. 162, отличающийся тем, что композиция содержит антитело, которое связывается с доменом SRCR (остатки 424-519 SEQ ID NO: 384) MARCO человека.

164. Способ по п. 162 или п. 163, отличающийся тем, что композиция содержит выделенное антитело по любому из пп. 1-118 или включает фармацевтическую композицию по п. 123.

165. Способ по любому из пп. 162-164, отличающийся тем, что иммунотерапия включает в себя по меньшей мере одно из следующего: ингибитор контрольной точки; ингибитор контрольной точки Т-клеток; и антитело к PD1.

166. Способ по п. 165, отличающийся тем, что иммунотерапия включает в себя антитело к PD1.

167. Способ по любому из пп. 155-190, отличающийся тем, что субъект представляет собой человека.

168. Способ по любому из пп. 155-167, отличающийся тем, что рак представляет собой солидный рак.

169. Способ по любому из пп. 155-168, отличающийся тем, что рак представляет собой гемобластоз.

170. Способ по любому из пп. 155-169, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из: рака легкого, аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака почки, рака печени, почечно-клеточного рака, рака шейки матки, рака яичников, колоректального рака, рака толстой кишки, нейробластомы, рака молочной железы, трижды негативного рака молочной железы, базальноподобного рака молочной железы, рака желудка, рака желудка, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака кожи, лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, неходжкинской лимфомы, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака эндометрия, рака головы и шеи или плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSC).

171. Способ по п. 170, отличающийся тем, что рак представляет собой рак толстой кишки, рак молочной железы, базальноподобный рак молочной железы, рак яичников или рак желудка.

172. Способ по любому из пп. 155-171, отличающийся тем, что MARCO экспрессируется на более высоком уровне на иммунной клетке, которая находится в пределах опухоли, по сравнению с иммунной клеткой, которая находится вне опухоли.

173. Способ по любому из пп. 155-172, отличающийся тем, что IL-10 экспрессируется на более высоком уровне на иммунной клетке, которая находится в пределах опухоли, по сравнению с иммунной клеткой, которая находится вне опухоли.

174. Способ по любому из пп. 155-173, в котором антитело индуцирует повышенный противоопухолевый вторичный ответ по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

175. Способ по любому из пп. 155-174, отличающийся тем, что введение усиливает иммунный ответ у субъекта по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

176. Способ по п. 175, отличающийся тем, что усиленный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ.

177. Способ по п. 175, отличающийся тем, что усиленный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.

178. Способ по любому из пп. 175-177, отличающийся тем, что повышенный иммунный ответ включает экспрессию по меньшей мере одного цитокина или хемокина клеткой по сравнению с изотипическим контрольным антителом, необязательно измеренную с помощью анализа нуклеиновой кислоты или белка.

179. Способ по п. 178, отличающийся тем, что по меньшей мере один цитокин или хемокин включают по меньшей мере один из IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL7R, IL-12, IL12-p70, IL-15, IL-18, IL-27, IP-10, IFN- γ , TNF α , MIP1- α , MIP1- β , MIP-2, CSF2, CSF3, G-CSF, M-CSF, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CCL24, CXCL1, CXCL3, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, GRO-альфа, MCP-1, MCP-3, LIF или эотаксина.

180. Способ по любому из пп. 175-179, отличающийся тем, что повышенный иммунный ответ включает повышенную активацию НК-клеток, регуляцию В-клеток, пролиферацию Т-клеток, активацию Т-клеток или дифференцировку Т-клеток по сравнению с изотипическим контрольным антителом, необязательно измеренную с помощью анализа нуклеиновой кислоты или белка.

181. Способ по любому из пп. 175-180, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело индуцирует при контакте с клетками антитело индуцирует сигналинг IL-2-STAT5, сигналинг NF-kB, сигналинг TLR, сигналинг адгезии и подвижности, сигналинг перестройки цитоскелета, сигналинг TNF α через NF-kB, сигналинг IL-6-JAK-STAT3, сигналинг SYK, сигналинг MAPK, сигналинг TPL2, кальциевый сигналинг, ответ IFN γ или ответ IFN α по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

182. Способ по любому из пп. 175-181, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело подавляет путь клеточного цикла, выживаемость клеток, клеточную адгезию, путь мишени Мус, путь мишеней E2F, гипоксию, сигнальный путь mTOR, сигнальный путь PI3K-AKT, сигнальный путь Src, сигнальный путь PKC, сигнальный

путь эпителиально-мезенхимального перехода, окислительное фосфорилирование или сигнальный путь MAPK по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

183. Способ по любому из пп. 175-182, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело индуцирует активацию инфламмасом, что определяется секрецией IL-1 β и/или IL-18 и/или фагоцитозом по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

184. Способ по любому из пп. 175-183, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело индуцирует реполяризацию миелоидных M2-подобных TAM в M1-подобные TAM и/или реполяризацию mMDSC в провоспалительные моноциты по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

185. Способ по любому из пп. 175-184, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело увеличивает количество CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, NK-клеток, дендритных клеток, MHCII⁺ макрофагов, MHCII^{high} моноцитов или MHCII^{mid} моноцитов по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

186. Способ по любому из пп. 175-185, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело увеличивает количество макрофагов, макрофагов маргинальной зоны, фолликулярных В-клеток и/или макрофагов красной пульпы в селезенке по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

187. Способ по любому из пп. 175-186, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело снижает количество TAM, ассоциированных с опухолью нейтрофилов, В-клеток плазмы, В-клеток маргинальной зоны, CD19⁺ В-клеток, MHCII⁻ моноцитов и/или MHCII⁻ макрофагов по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

188. Способ по любому из пп. 155-187, отличающийся тем, что клетка представляет собой MARCO⁺ клетку.

189. Способ по п. 188, отличающийся тем, что клетка представляет собой человеческую MARCO⁺ клетку.

190. Способ по п. 188 или п. 189, отличающийся тем, что MARCO⁺ клетка представляет собой моноцит, моноцитарную клетку-супрессор миелоидного происхождения (mMDSC) или макрофаг.

191. Способ по п. 190, отличающийся тем, что макрофаг представляет собой ассоциированный с опухолью макрофаг (TAM) или моноцитарный макрофаг (MDM).

192. Способ по любому из пп. 155-191, отличающийся тем, что антитело связывается с MARCO на поверхности MARCO⁺ клетки.

193. Способ инактивации миелоидных клеток, которые экспрессируют MARCO на своей поверхности, включающий приведение миелоидных клеток в контакт с антителом к MARCO человека или его антигенсвязывающим фрагментом.

194. Способ инактивации миелоидных клеток, которые экспрессируют MARCO на своей поверхности, включающий приведение миелоидных клеток в контакт с антителом по любому из пп. 1-118 или фармацевтической композицией по п. 123.

195. Способ по п. 193 или п. 194, отличающийся тем, что антитело инактивирует миелоидные клетки посредством по меньшей мере одного из активности АЗКЦ, активности КЗЦ или активности АЗКФ, необязательно при этом антитело инактивирует миелоидные клетки посредством активности АЗКЦ, необязательно при этом антитело инактивирует миелоидные клетки посредством активности КЗЦ, и необязательно, при этом антитело инактивирует миелоидные клетки посредством активности АЗКФ.

196. Способ по любому из пп. 193-195, отличающийся тем, что миелоидная клетка представляет собой MARCO+ клетку.

197. Способ по п. 196, отличающийся тем, что миелоидная клетка представляет собой человеческую MARCO+ клетку.

198. Способ по любому из пп. 193-197, отличающийся тем, что миелоидная клетка представляет собой моноцит, моноцитарную клетку-супрессор миелоидного происхождения (mMDSC) или макрофаг.

199. Способ по п. 198, отличающийся тем, что макрофаг представляет собой ассоциированный с опухолью макрофаг (TAM) или моноцитарный макрофаг (MDM).

200. Способ по любому из пп. 193-199, отличающийся тем, что миелоидные клетки представляют собой внутриопухольевые или селезеночные миелоидные клетки.

201. Способ по п. 200, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют *in vitro* или *in vivo*.

202. Способ по п. 201, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют *in vivo* у субъекта, необязательно при этом у субъекта имеется рак.

203. Способ по п. 202, отличающийся тем, что субъект представляет собой человека.

204. Способ по п. 202, отличающийся тем, что рак представляет собой солидный рак.

205. Способ по п. 202, отличающийся тем, что рак представляет собой гемобластоз.

206. Способ по любому из пп. 202-205, отличающийся тем, что рак выбран из группы, состоящей из: рака легкого, аденокарциномы легкого, плоскоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, рака почки, рака печени, почечно-клеточного рака, рака шейки матки, рака яичников, колоректального рака, рака толстой кишки, нейробластомы, рака молочной железы, трижды негативного рака молочной железы, базальноподобного рака молочной железы, рака желудка, рака желудка, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака кожи, лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, неходжкинской лимфомы, мезотелиомы, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, рака эндометрия, рака головы и шеи или плоскоклеточного рака головы и шеи (HNSC).

207. Способ по п. 206, отличающийся тем, что рак представляет собой рак толстой кишки, рак молочной железы, базальноподобный рак молочной железы, рак яичников или рак желудка.

208. Способ по любому из пп. 194-207, отличающийся тем, что антитело индуцирует противоопухолевый вторичный ответ по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

209. Способ по п. 208, отличающийся тем, что усиленный иммунный ответ представляет собой адаптивный иммунный ответ.

210. Способ по п. 208, отличающийся тем, что усиленный иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ.

211. Способ по любому из пп. 208-210, отличающийся тем, что повышенный иммунный ответ включает экспрессию по меньшей мере одного цитокина или хемокина клеткой по сравнению с изотипическим контрольным антителом, необязательно измеренную с помощью анализа нуклеиновой кислоты или белка.

212. Способ по п. 211, отличающийся тем, что по меньшей мере один цитокин или хемокин включают по меньшей мере один из IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL7R, IL-12, IL12-p70, IL-15, IL-18, IL-27, IP-10, IFN- γ , TNF α , MIP1- α , MIP1- β , MIP-2, CSF2, CSF3, G-CSF, M-CSF, CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, CCL24, CXCL1, CXCL3, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12, GRO-альфа, MCP-1, MCP-3, LIF или эотаксина.

213. Способ по любому из пп. 208-212, отличающийся тем, что повышенный иммунный ответ включает повышенную активацию НК-клеток, регуляцию В-клеток, пролиферацию Т-клеток, активацию Т-клеток или дифференцировку Т-клеток по сравнению с изотипическим контрольным антителом, необязательно измеренную с помощью анализа нуклеиновой кислоты или белка.

214. Способ по любому из пп. 208-213, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело индуцирует сигналинг IL-2-STAT5, сигналинг NF-kB, сигналинг TLR, сигналинг адгезии и подвижности, сигналинг перестройки цитоскелета, сигналинг TNF α через NF-kB, сигналинг IL-6-JAK-STAT3, сигналинг SYK, сигналинг MAPK, сигналинг TPL2, кальциевый сигналинг, ответ IFN γ или ответ IFN α по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

215. Способ по любому из пп. 208-214, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело подавляет путь клеточного цикла, выживаемость клеток, клеточную адгезию, путь мишени Мус, путь мишеней E2F, путь гипоксии, сигнальный путь mTOR, сигнальный путь PI3K-AKT, сигнальный путь Src, сигнальный путь PKC, сигнальный путь эпителиально-мезенхимального перехода, окислительное фосфорилирование или сигнальный путь MAPK по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

216. Способ по любому из пп. 208-215, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело индуцирует активацию инфламмасом, что определяется секрецией IL-1 β и/или IL-18, и/или фагоцитозом.

217. Способ по любому из пп. 208-216, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело индуцирует реполяризацию миелоидных M2-подобных TAM в M1-подобные TAM и/или реполяризацию mMDSC в провоспалительные моноциты.

218. Способ по любому из пп. 208-217, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело увеличивает количество CD8⁺ Т-клеток, CD4⁺ Т-клеток, НК-клеток, дендритных клеток, МНСII⁺ макрофагов, МНСII^{high} моноцитов или МНСII^{mid} моноцитов по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

219. Способ по любому из пп. 208-218, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело увеличивает количество макрофагов, макрофагов маргинальной зоны, фолликулярных В-клеток и/или макрофагов красной пульпы в селезенке по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

220. Способ по любому из пп. 208-219, отличающийся тем, что при контакте с клетками антитело снижает количество TAM, ассоциированных с опухолью нейтрофилов, В-клеток плазмы, В-клеток маргинальной зоны, CD19⁺ В-клеток, МНСII⁻ моноцитов и/или МНСII⁻ макрофагов по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

221. Способ по любому из пп. 194-220, отличающийся тем, что субъект ранее получал, совместно получает или будет получать иммунотерапию.

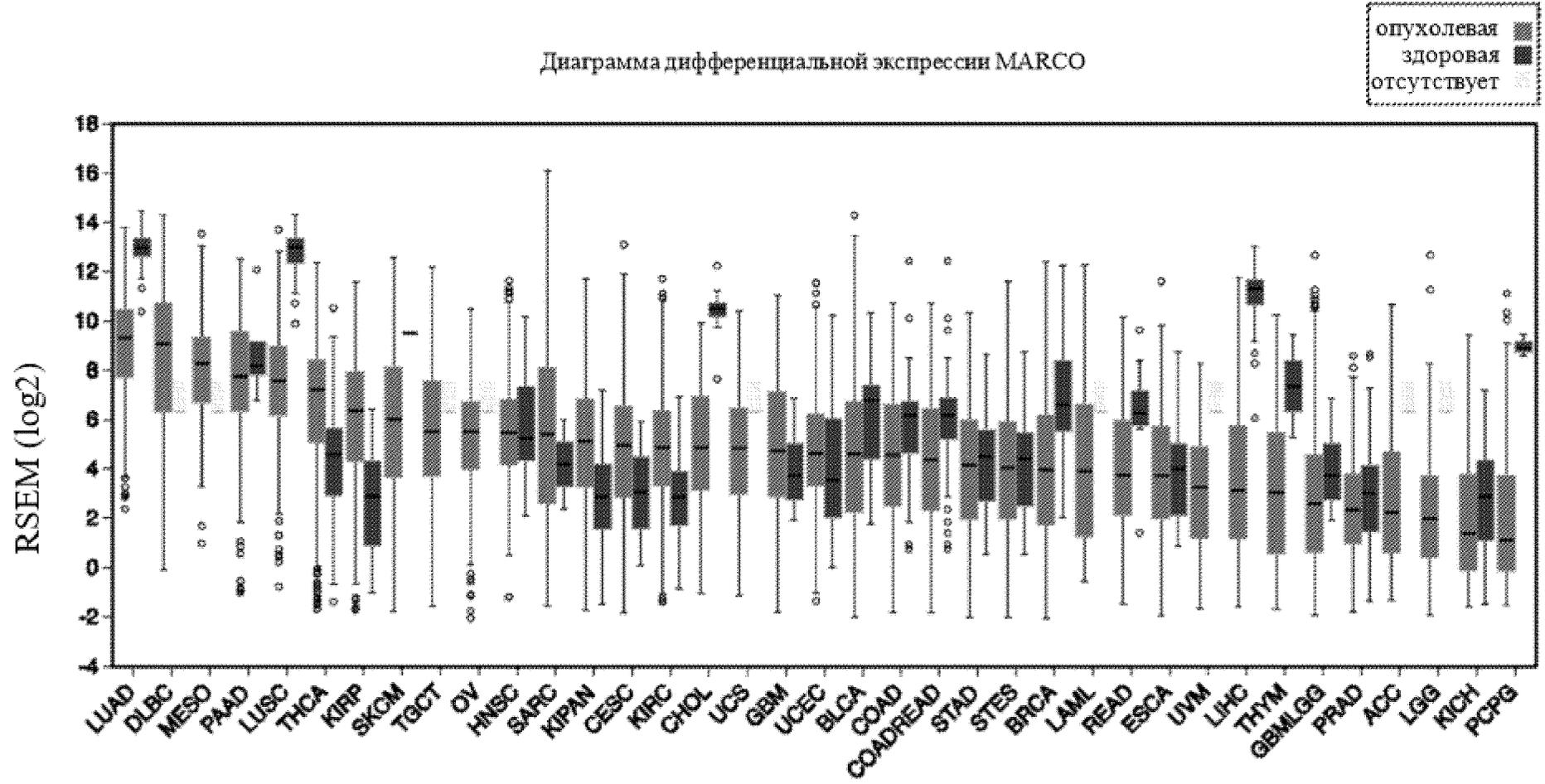
222. Способ по п. 221, отличающийся тем, что иммунотерапия включает в себя по меньшей мере одно из следующего: ингибитор контрольной точки; ингибитор контрольной точки Т-клеток; и антитело к PD1. Способ по п. 222, отличающийся тем, что иммунотерапия включает в себя антитело к PD1.

223. Способ определения уровня экспрессии белка MARCO в образце, взятом у субъекта, включает приведение образца в контакт с антителом к MARCO и проведение иммуногистохимического анализа или анализа растворимого MARCO.

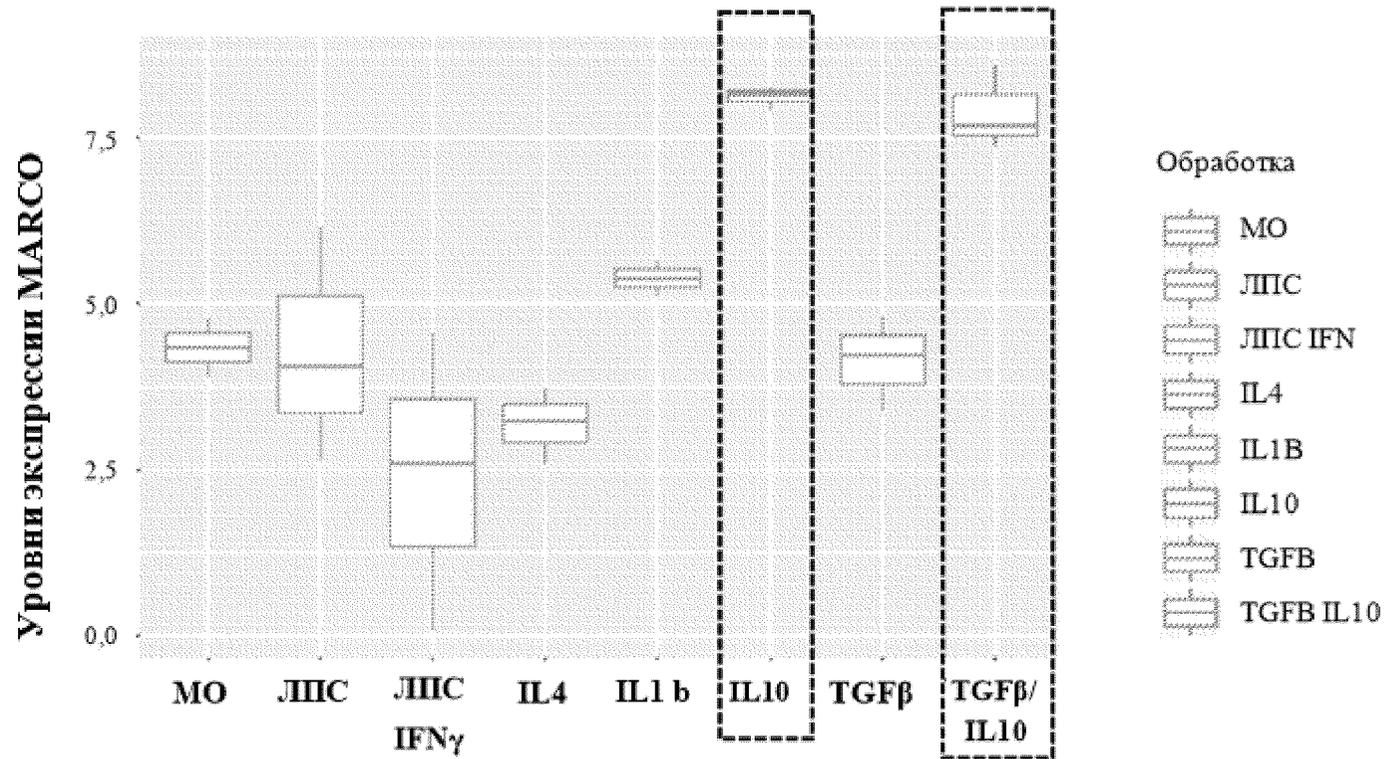
224. Способ по п. 223, отличающийся тем, что анализ представляет собой иммуногистохимический анализ, и антитело включает RDM5, RDM9, PI-3010.15, PI-3010.25 или PI-3030.41.

По доверенности

Фиг. 1

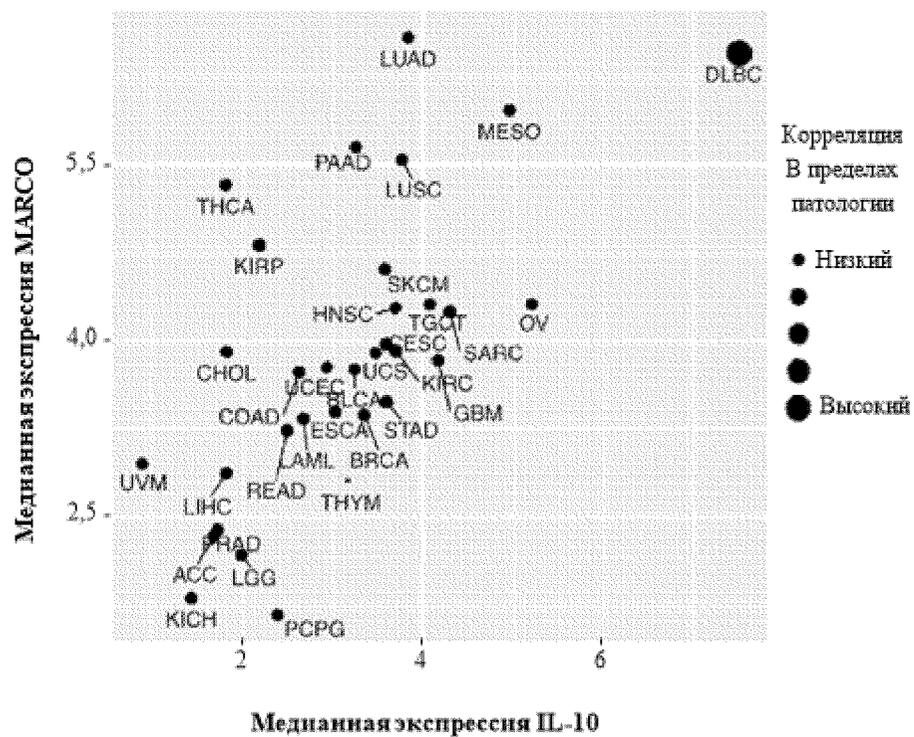


Фиг. 2

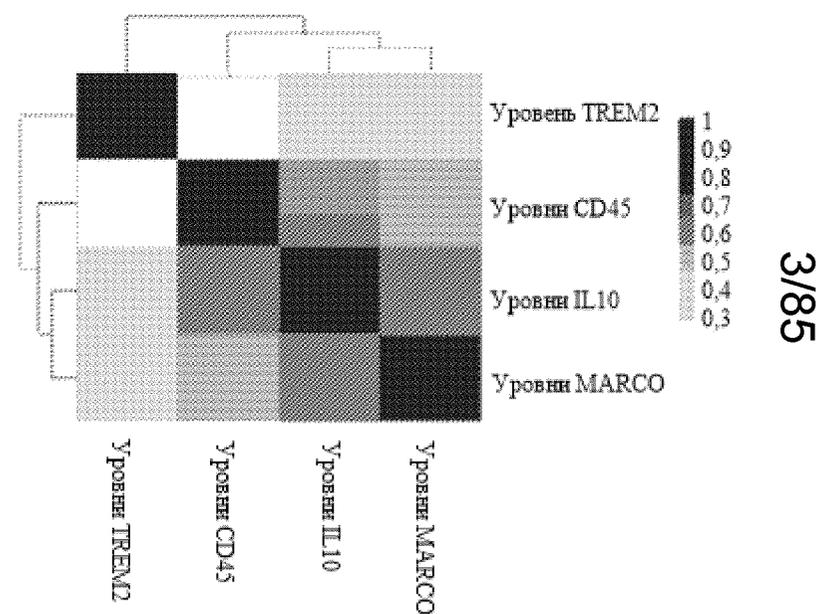


Единицы экспрессии: log₂ CPM

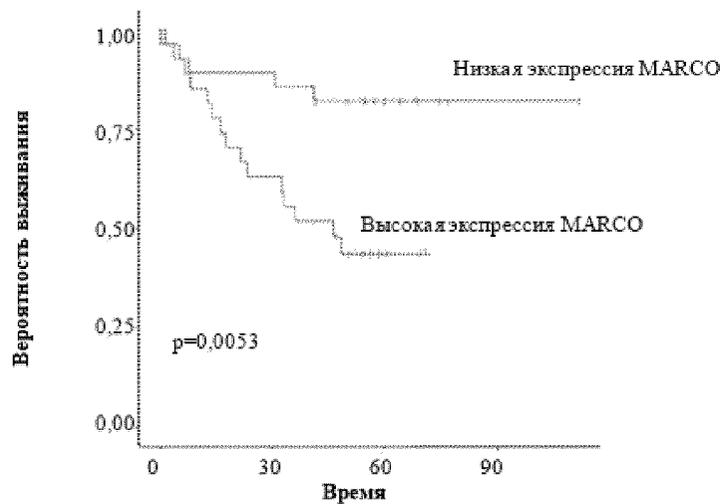
Фиг. 3А



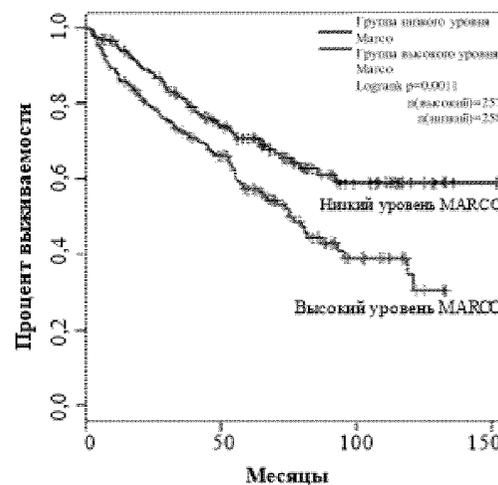
Фиг. 3В



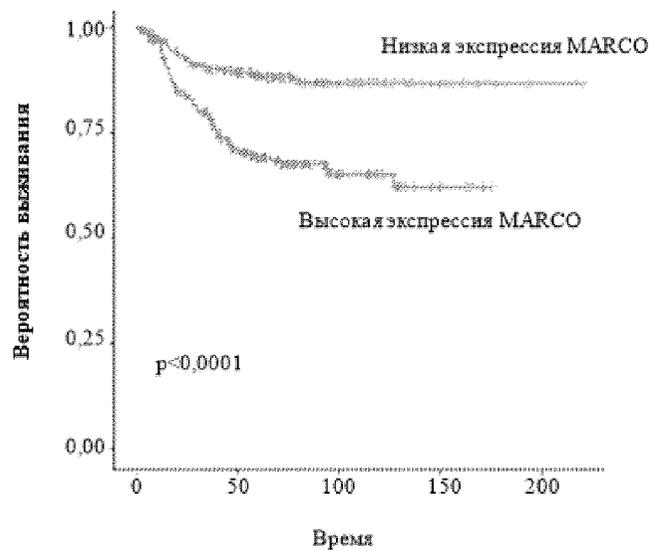
Фиг. 4А



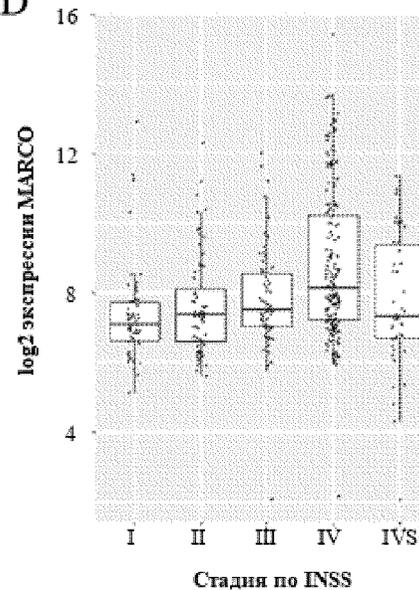
Фиг. 4В Общая выживаемость

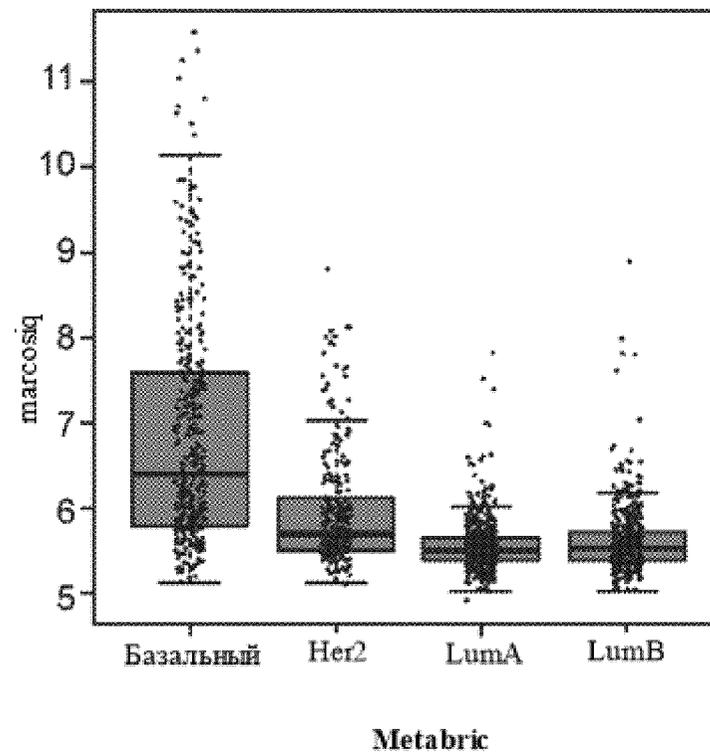
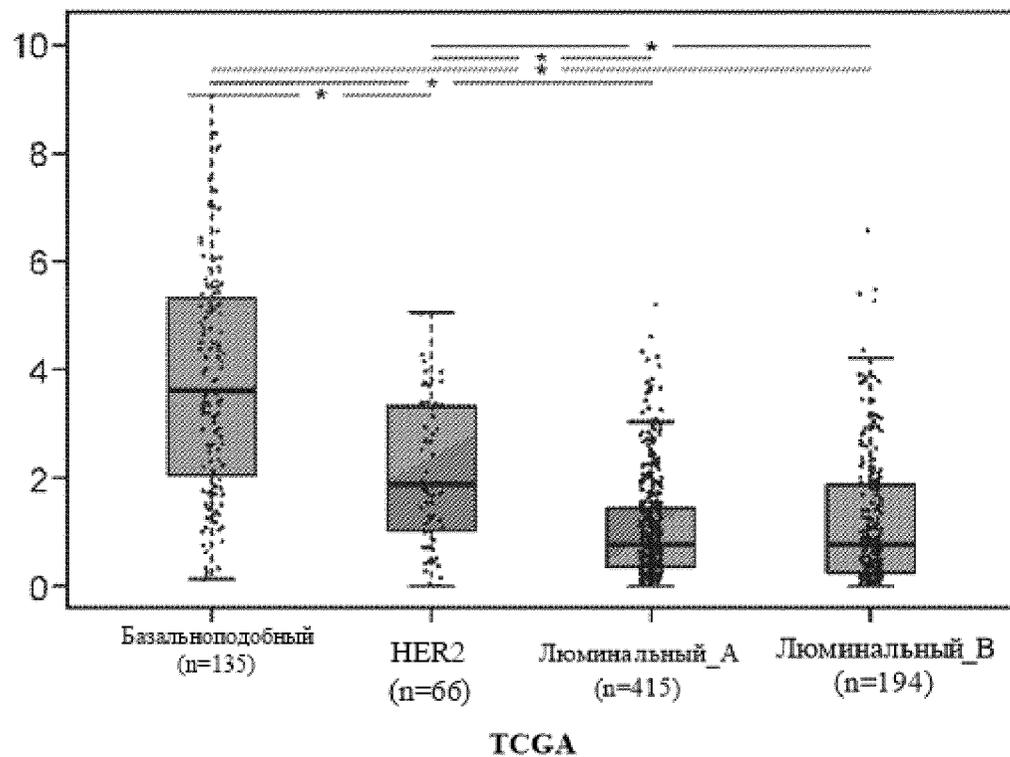


Фиг. 4С Стратификация по медиане Марко=MARCO_{hi} — медиана Марко=MARCO_{low}



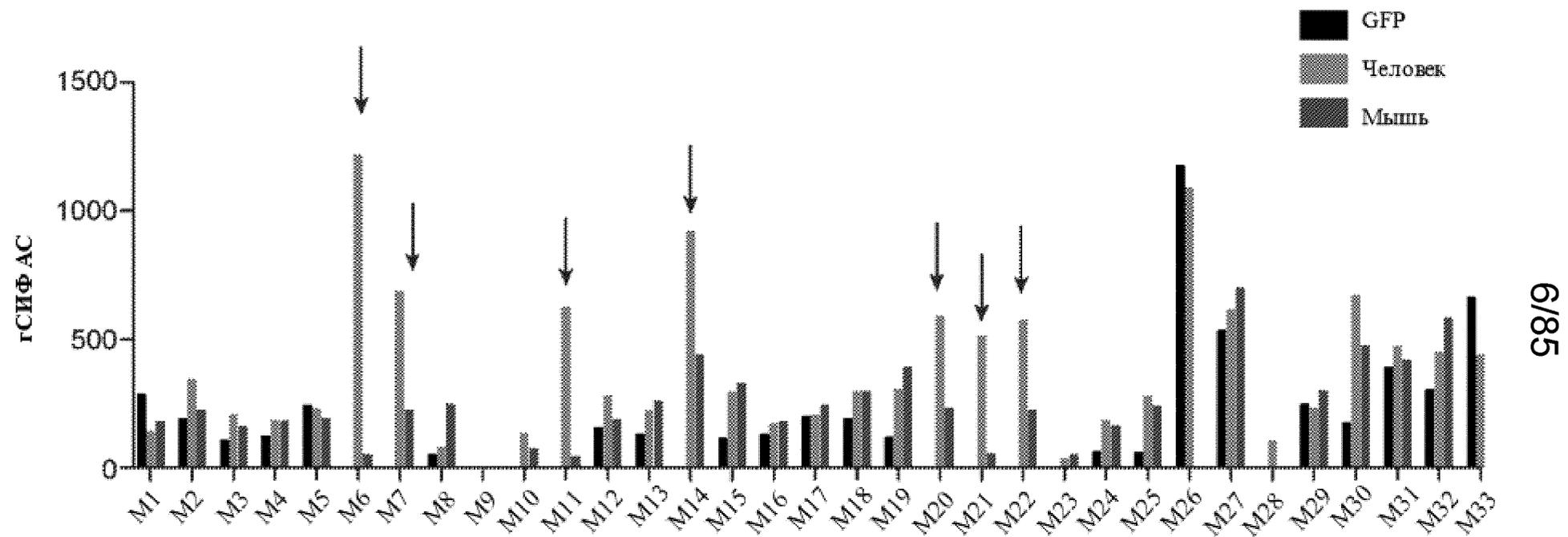
Фиг. 4D



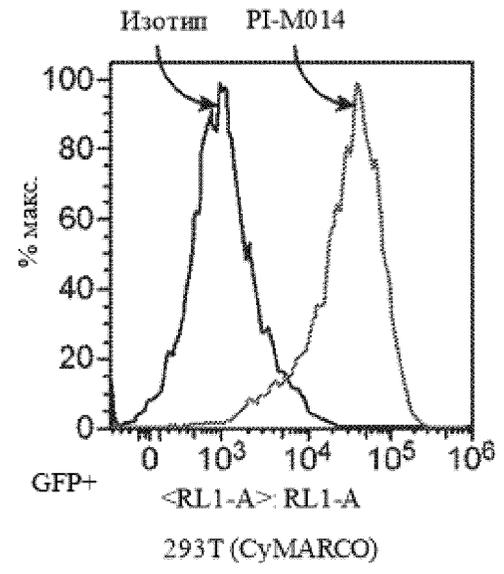
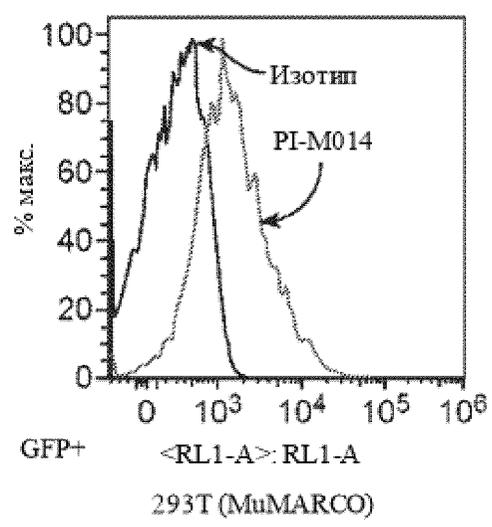
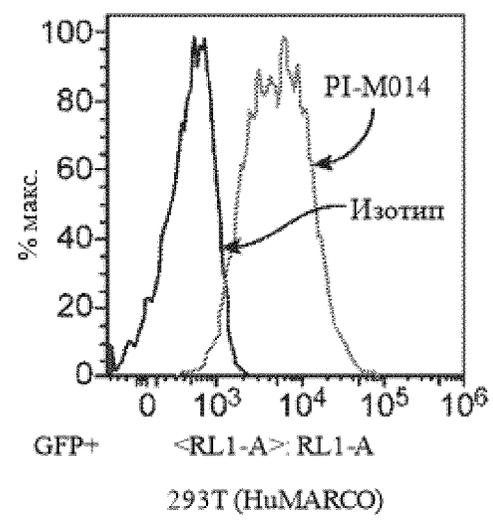
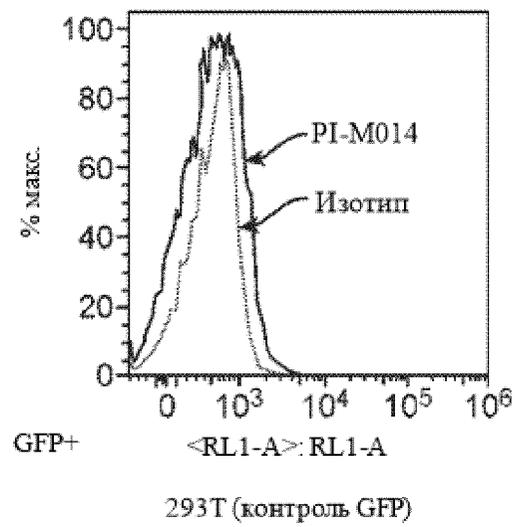


* p < 0,0001

Фиг. 5



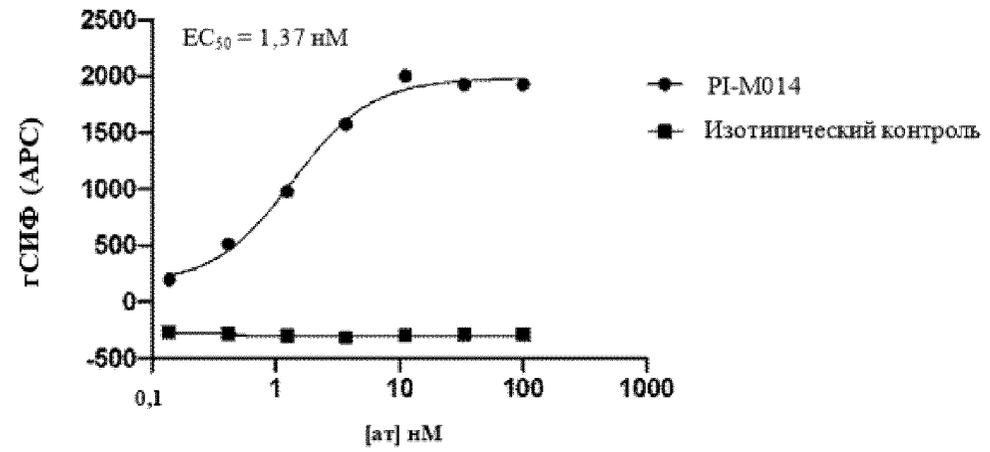
Фиг. 6А



ФИГ. 6В

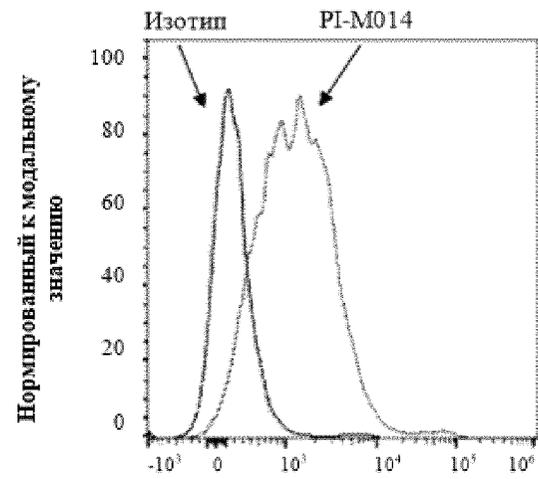
Фиг. 6С

293Т: (человеч_MARCO)



Фиг. 6D

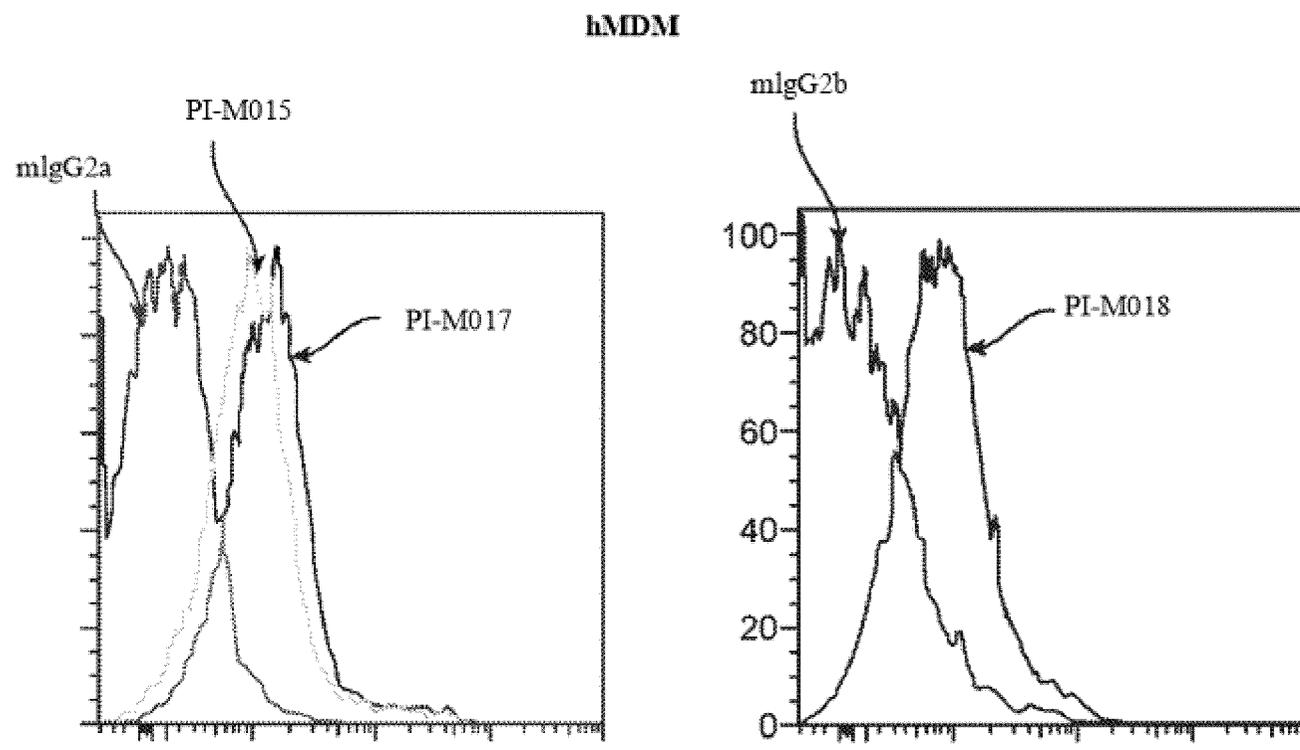
Человеческие моноцитарные макрофаги (hMDM)



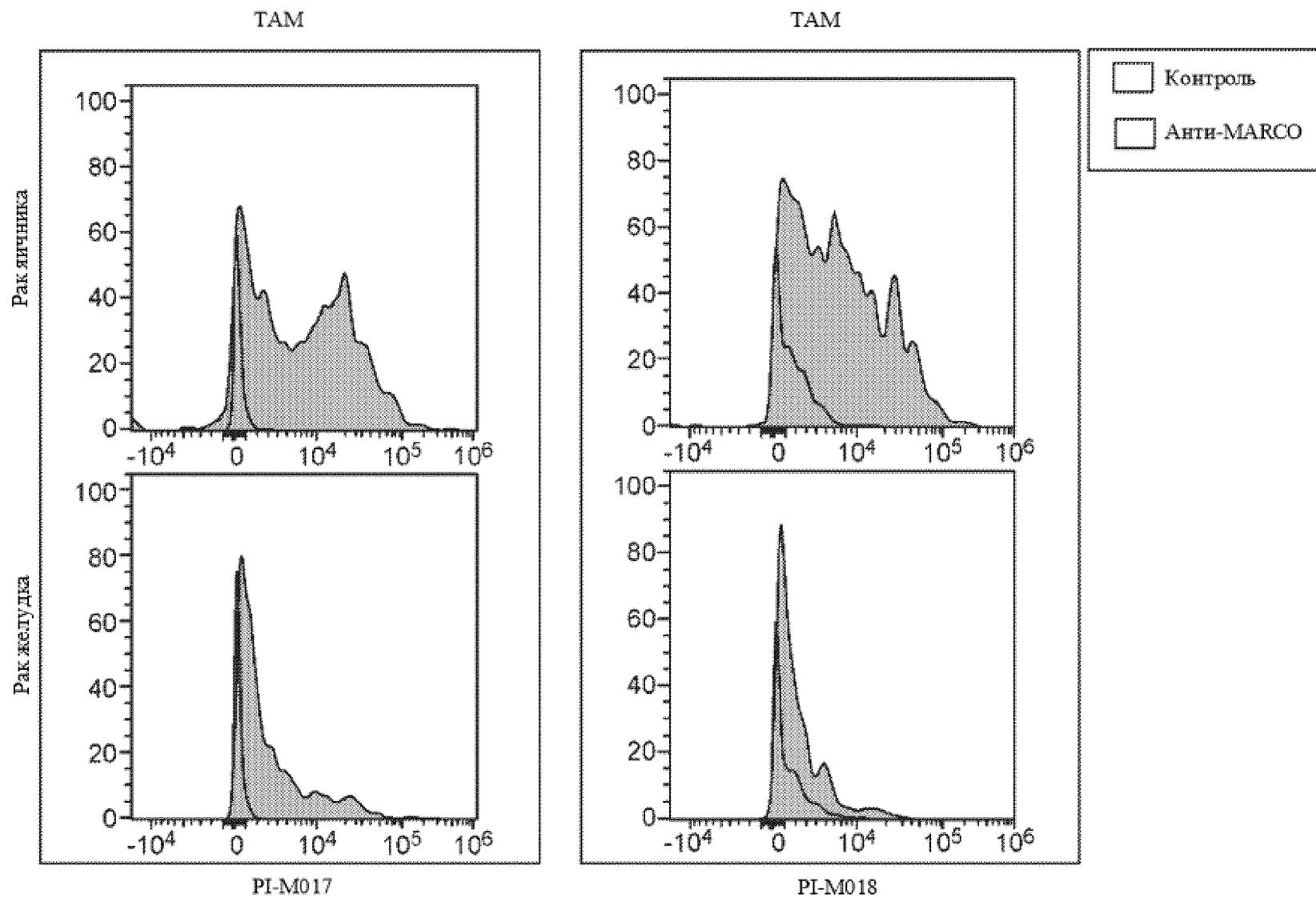
Фиг. 7

		Событие связывание второго мкАт				
		PI-M015	PI-M016	PI-M017	PI-M017	PI-M014
Событие связывание первого мкАт	PI-M015					
	PI-M016					
	PI-M017					
	PI-M018					
	PI-M014					

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ	Событие связывания в виде самассоциации
	Событие связывания одного и того же эпитопа
	Событие связывания другого эпитопа

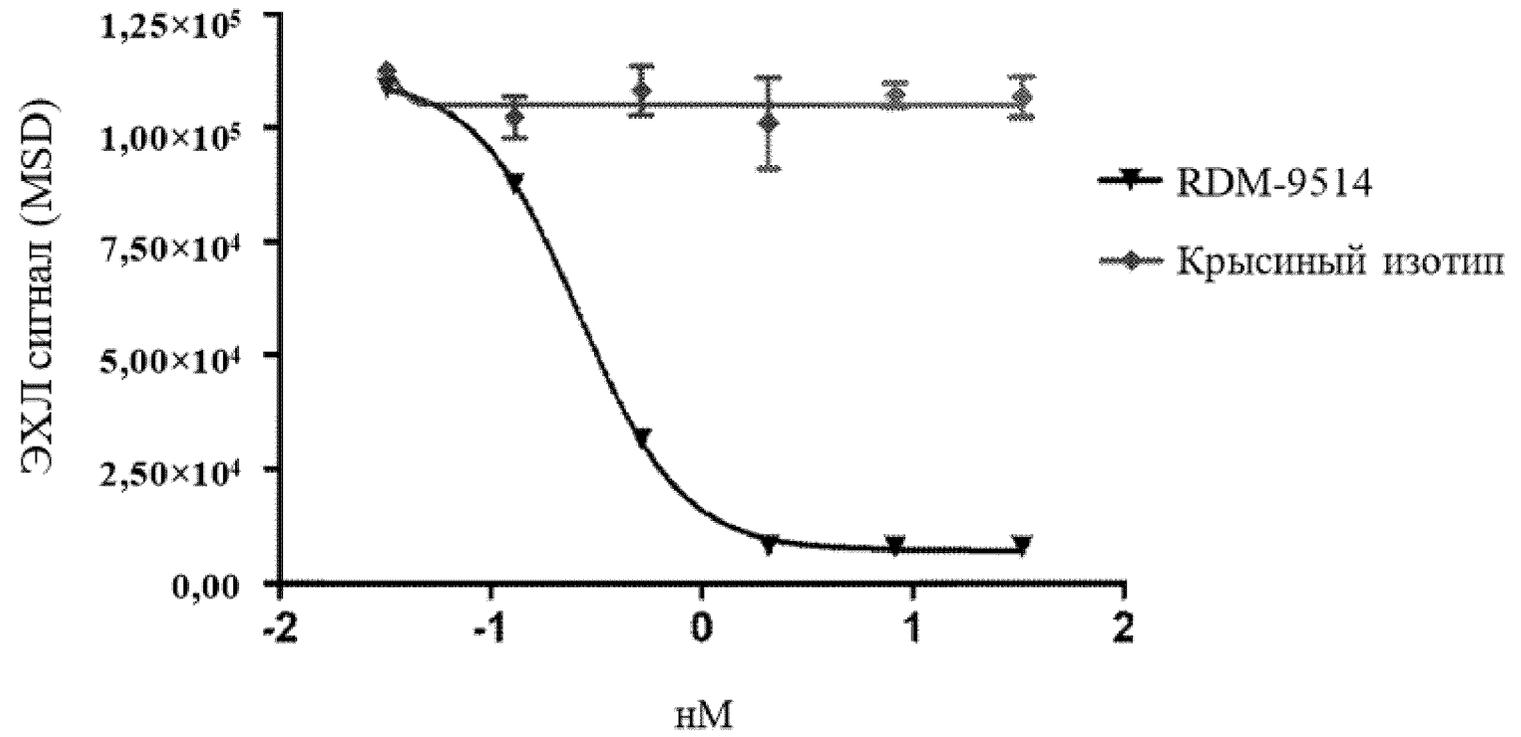


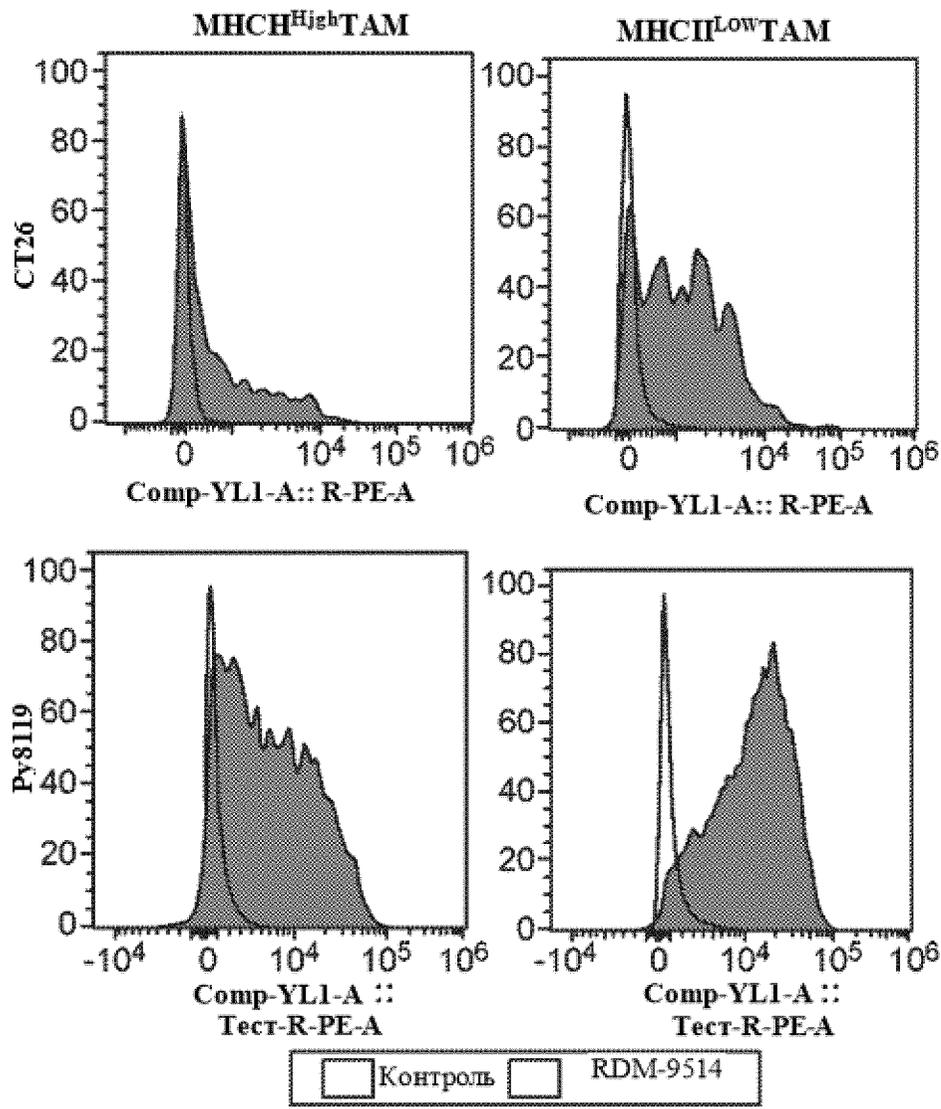
Фиг. 8А



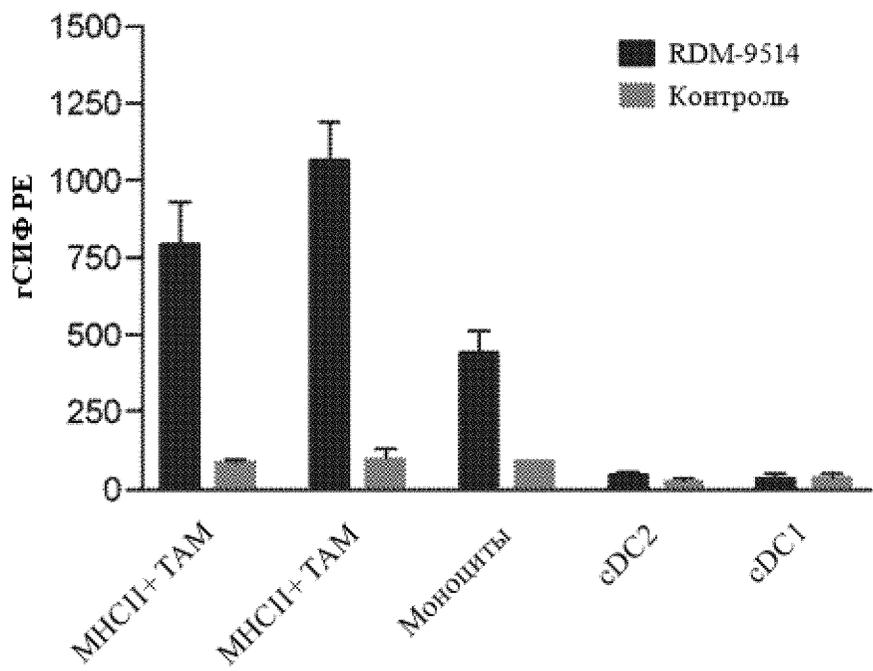
Фиг. 8В

Фиг. 9



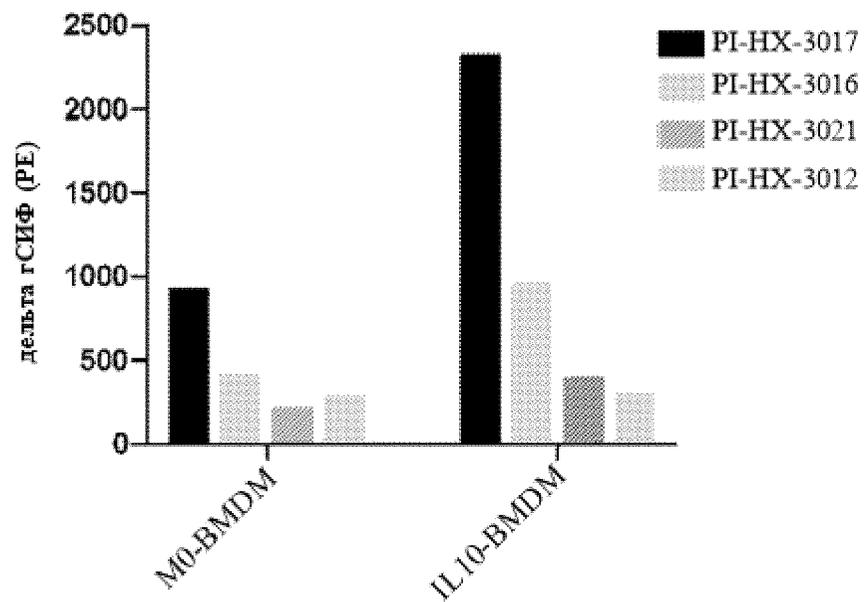


Фиг. 10А

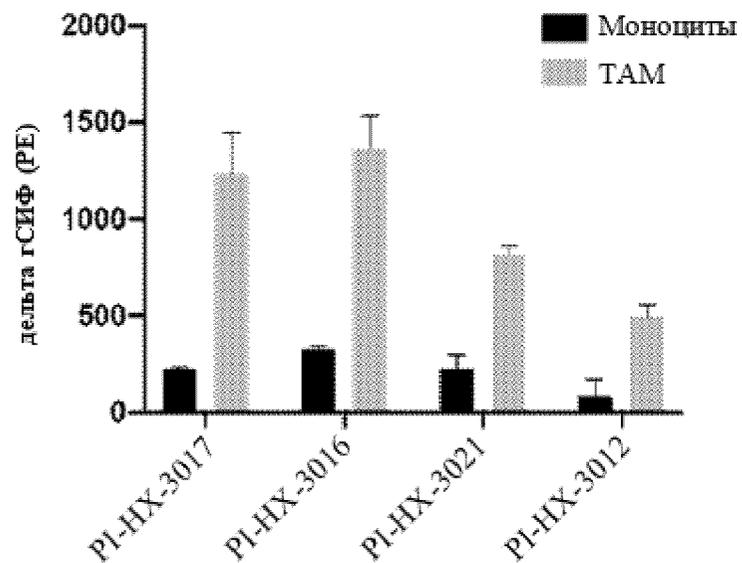


Фиг. 10В

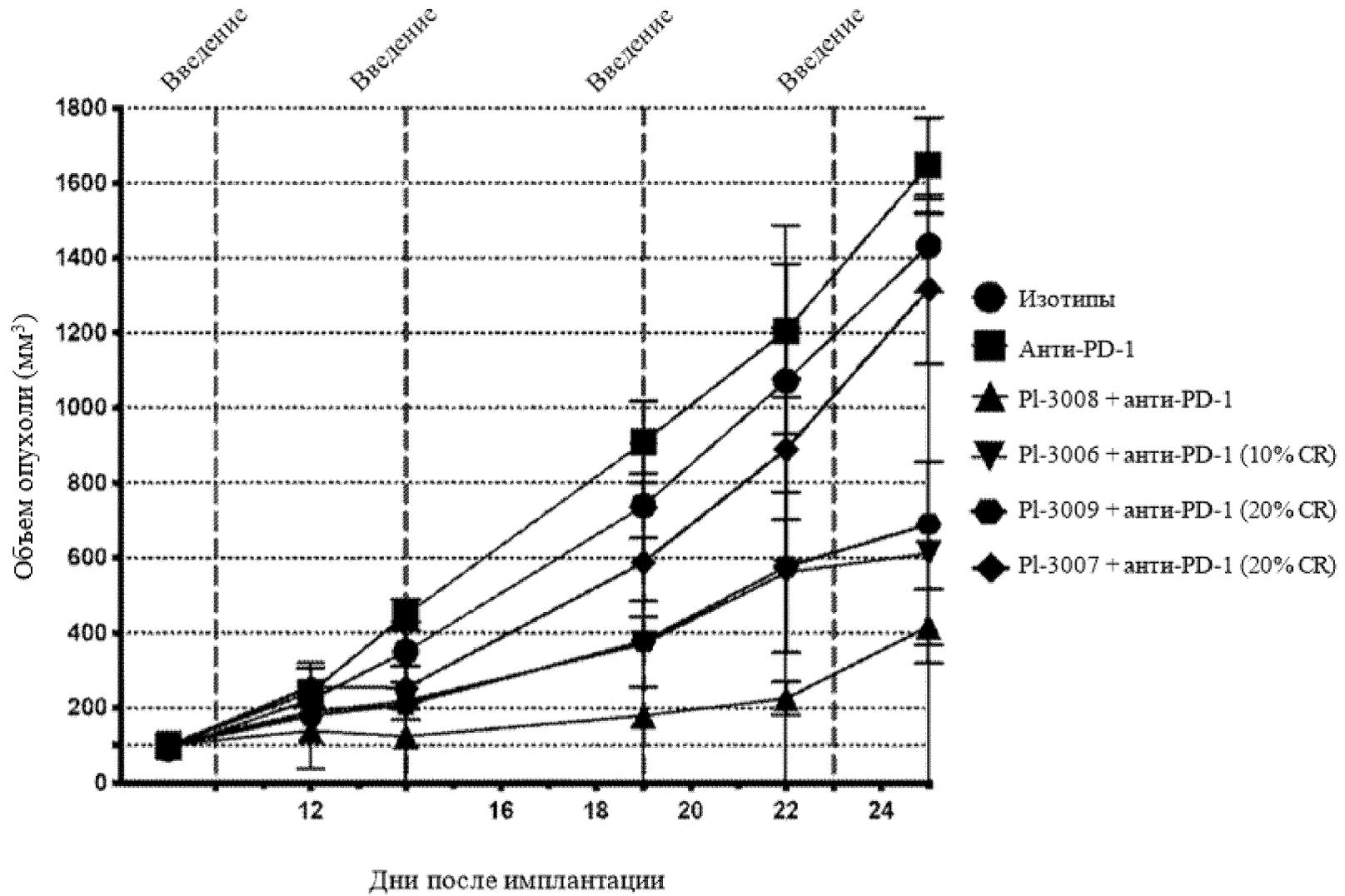
Фиг. 11А



Фиг. 11В

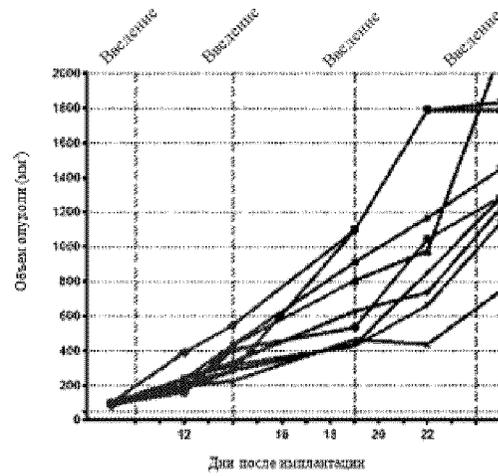


Фиг. 12



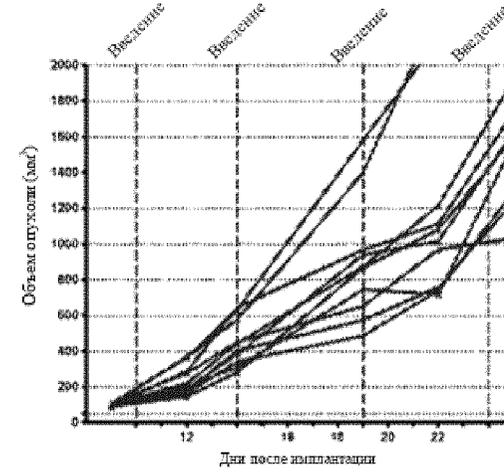
Фиг. 13А

Контроли



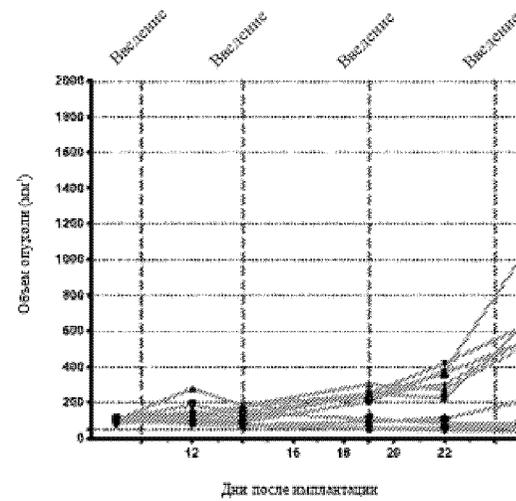
Фиг. 13В

Анти-PD-1



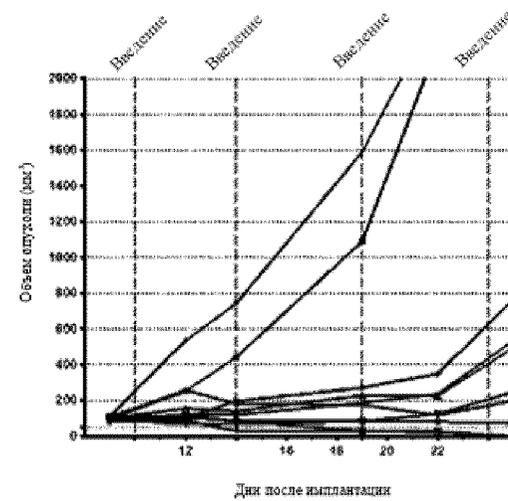
Фиг. 13С

PI-3008 + анти-PD-1

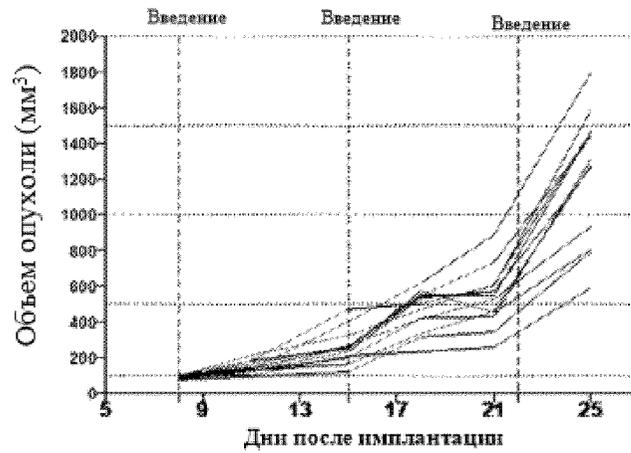


Фиг. 13D

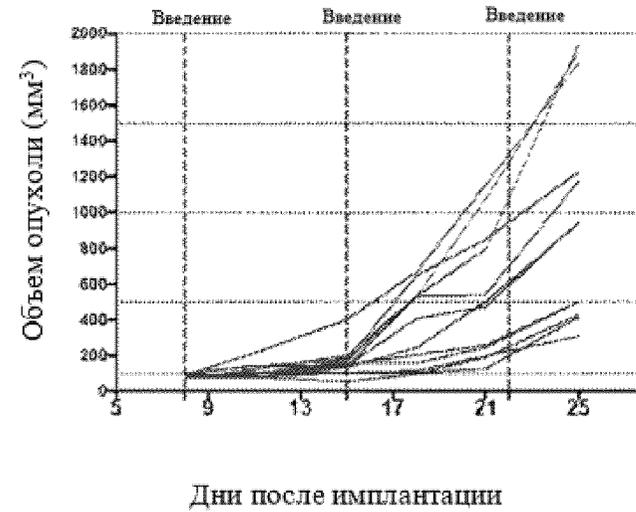
PI-3009 + анти-PD-1



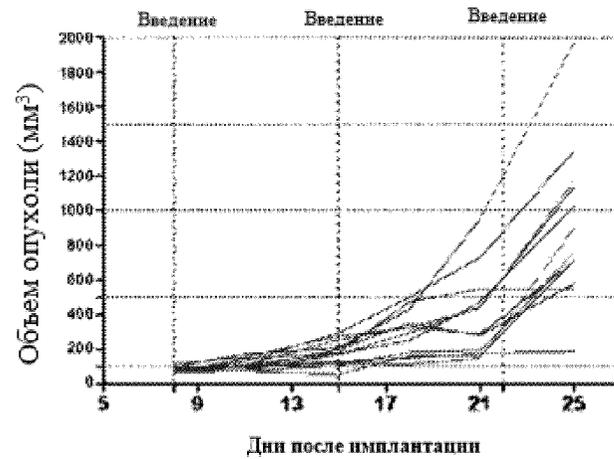
Фиг. 13Е
Изотип



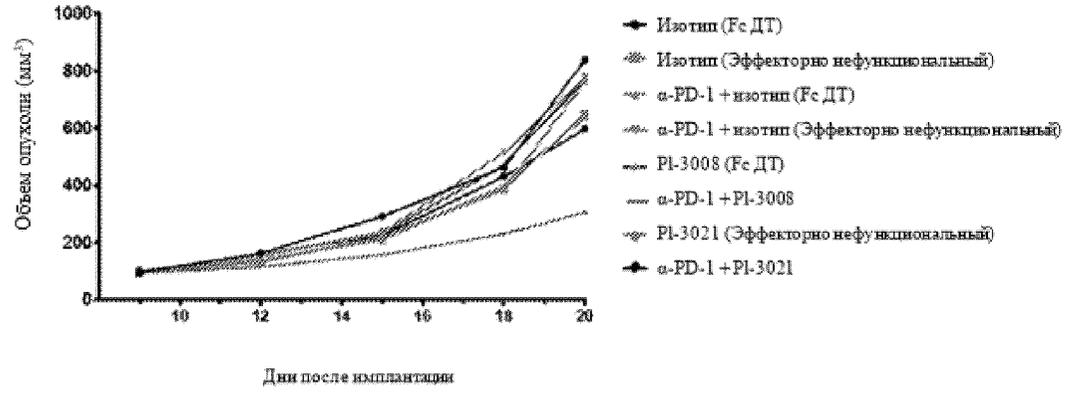
Фиг. 13F
PI-3008



Фиг. 13G
PI-3008 Афук

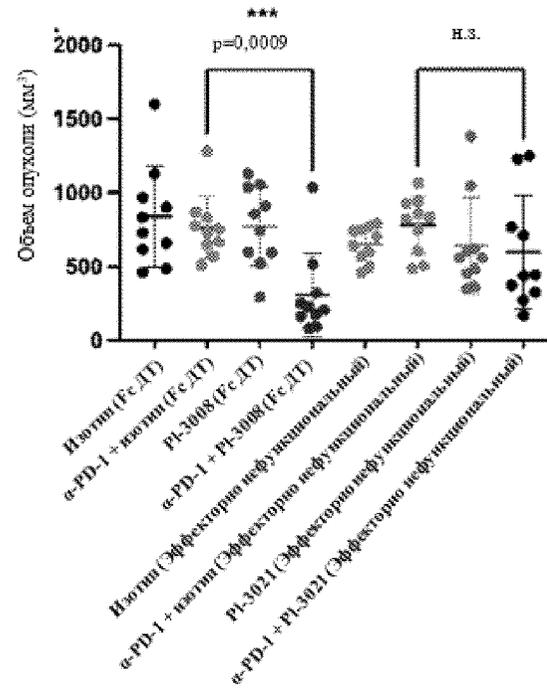


Фиг. 13Н



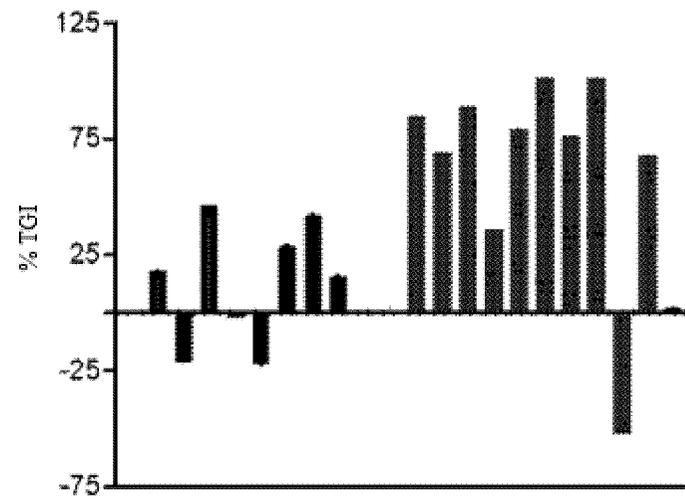
Конец исследования - 22 день

Фиг. 13I



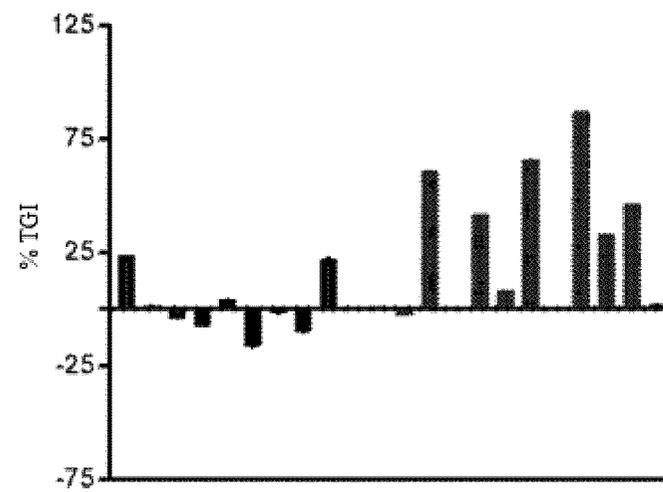
Фиг. 13J

% TGI, Отдельные мышцы
Изотип (Fc ДТ) и P1-3008+ α -PD-1

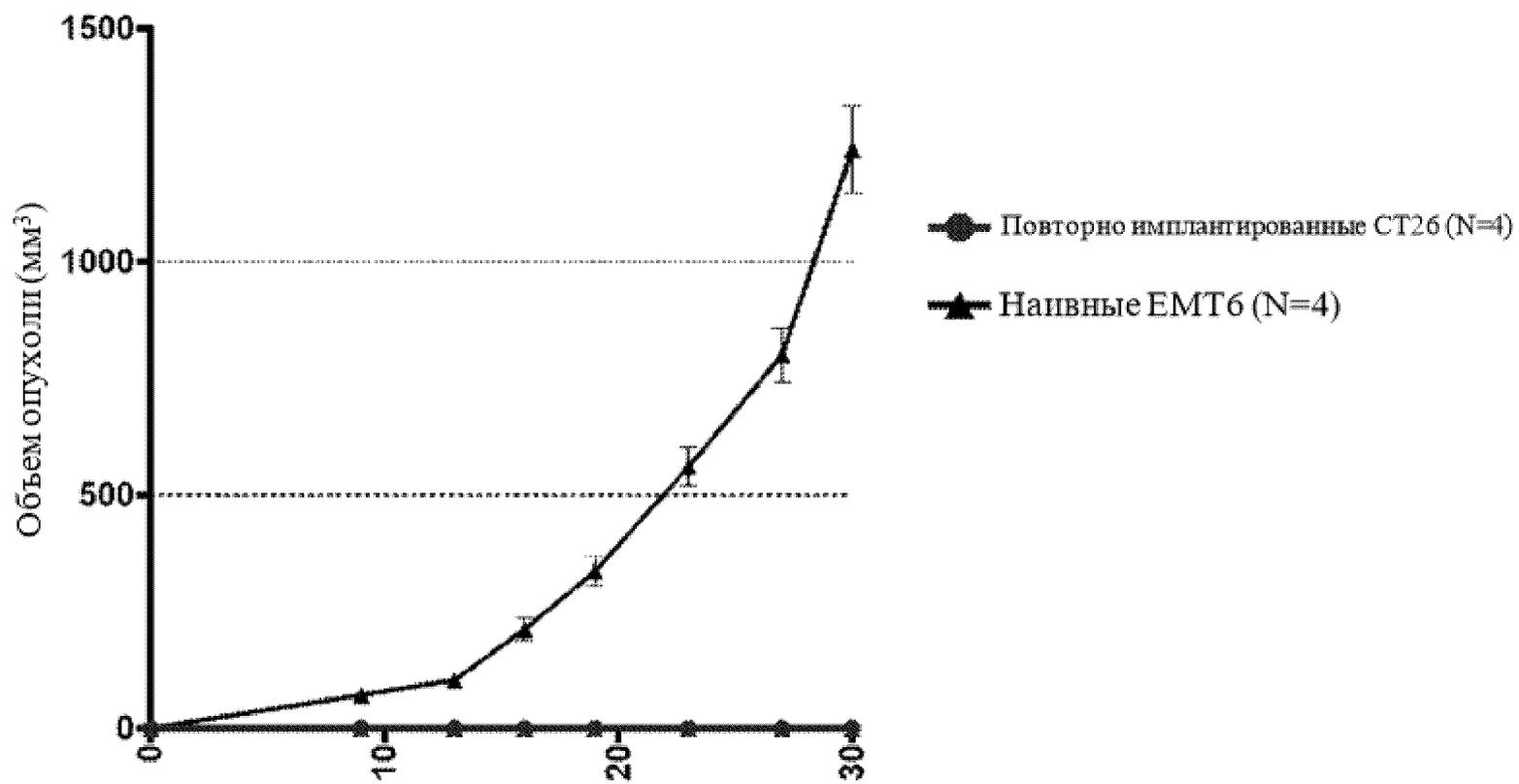


Фиг. 13K

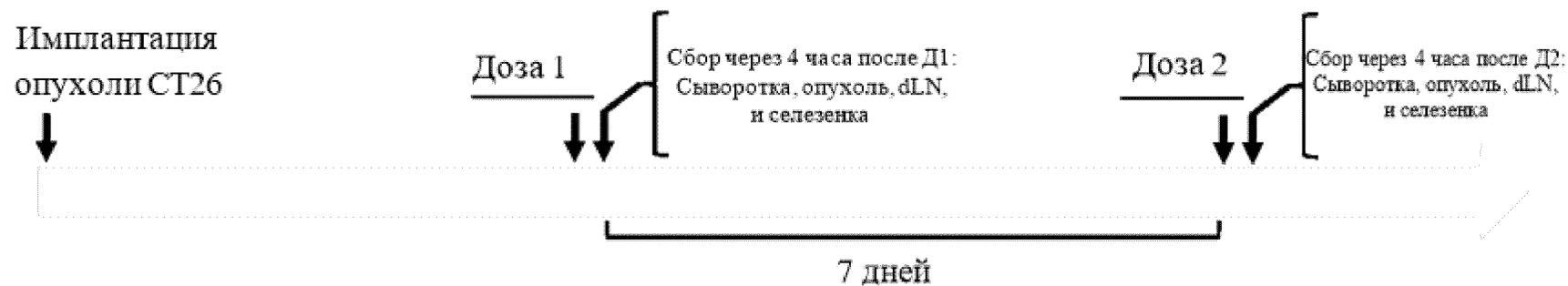
% TGI, Отдельные мышцы
Изотип (Эффекторно нефункциональная) и P1-3021 + α -PD-1



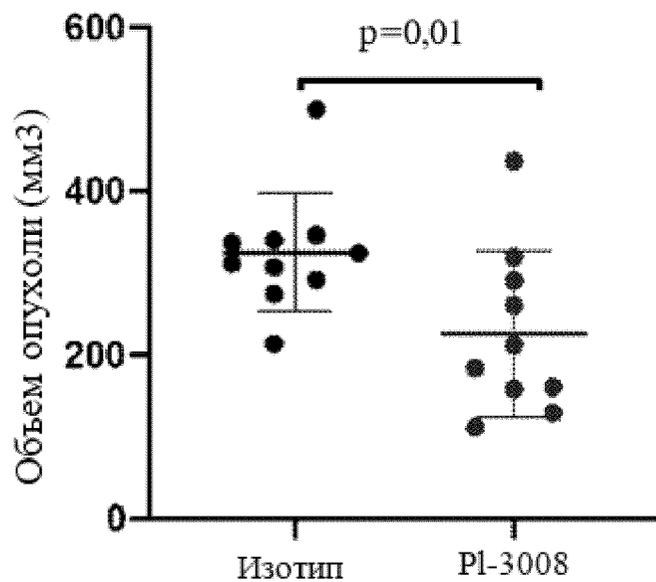
Фиг. 14



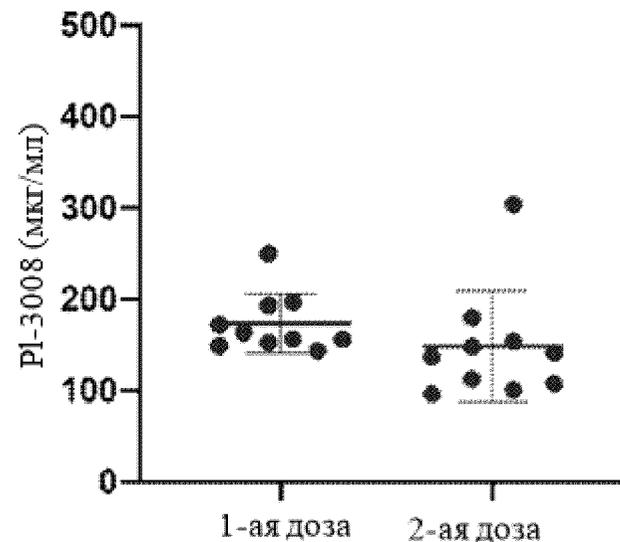
Фиг. 15А

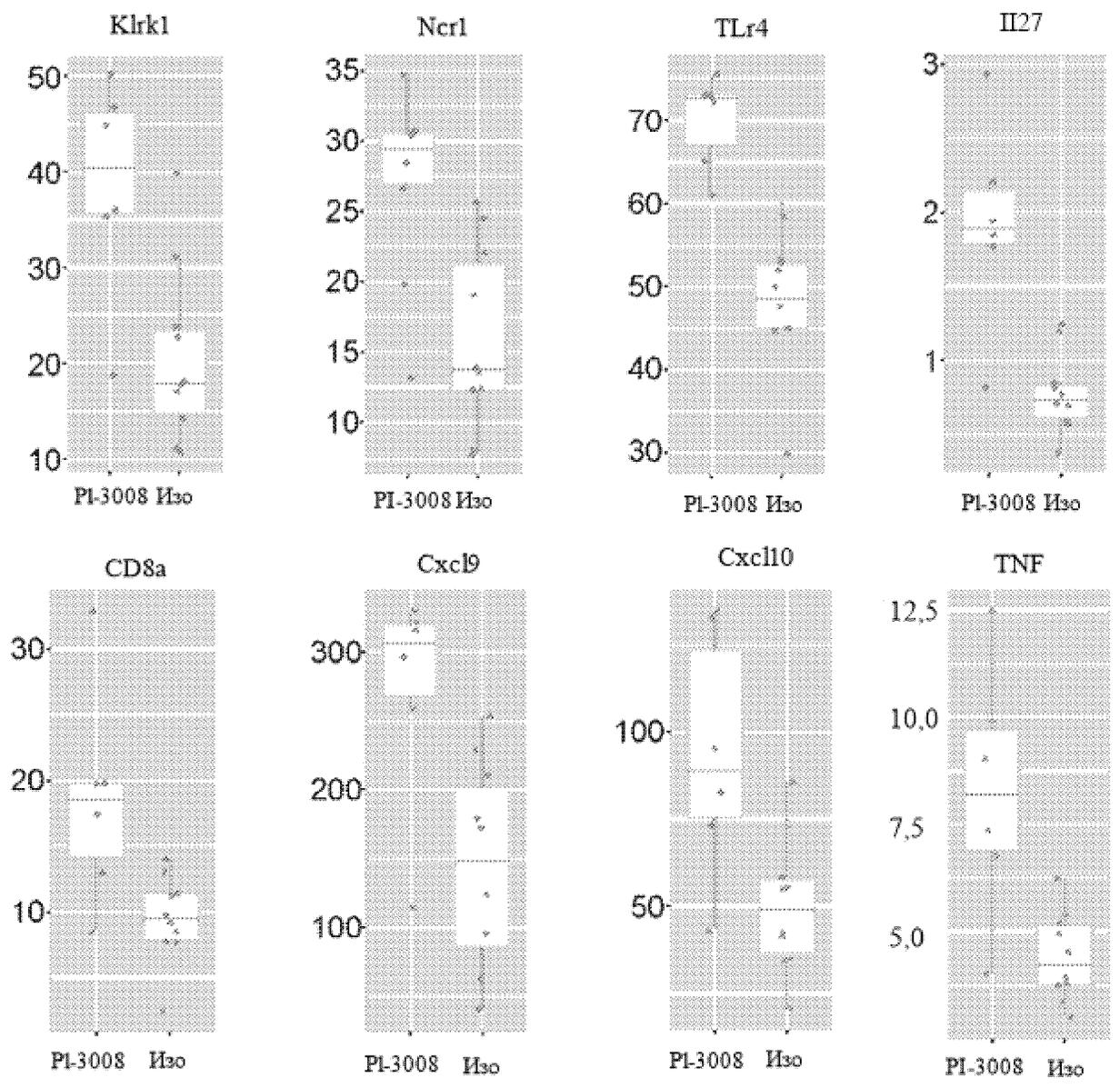


Фиг. 15В

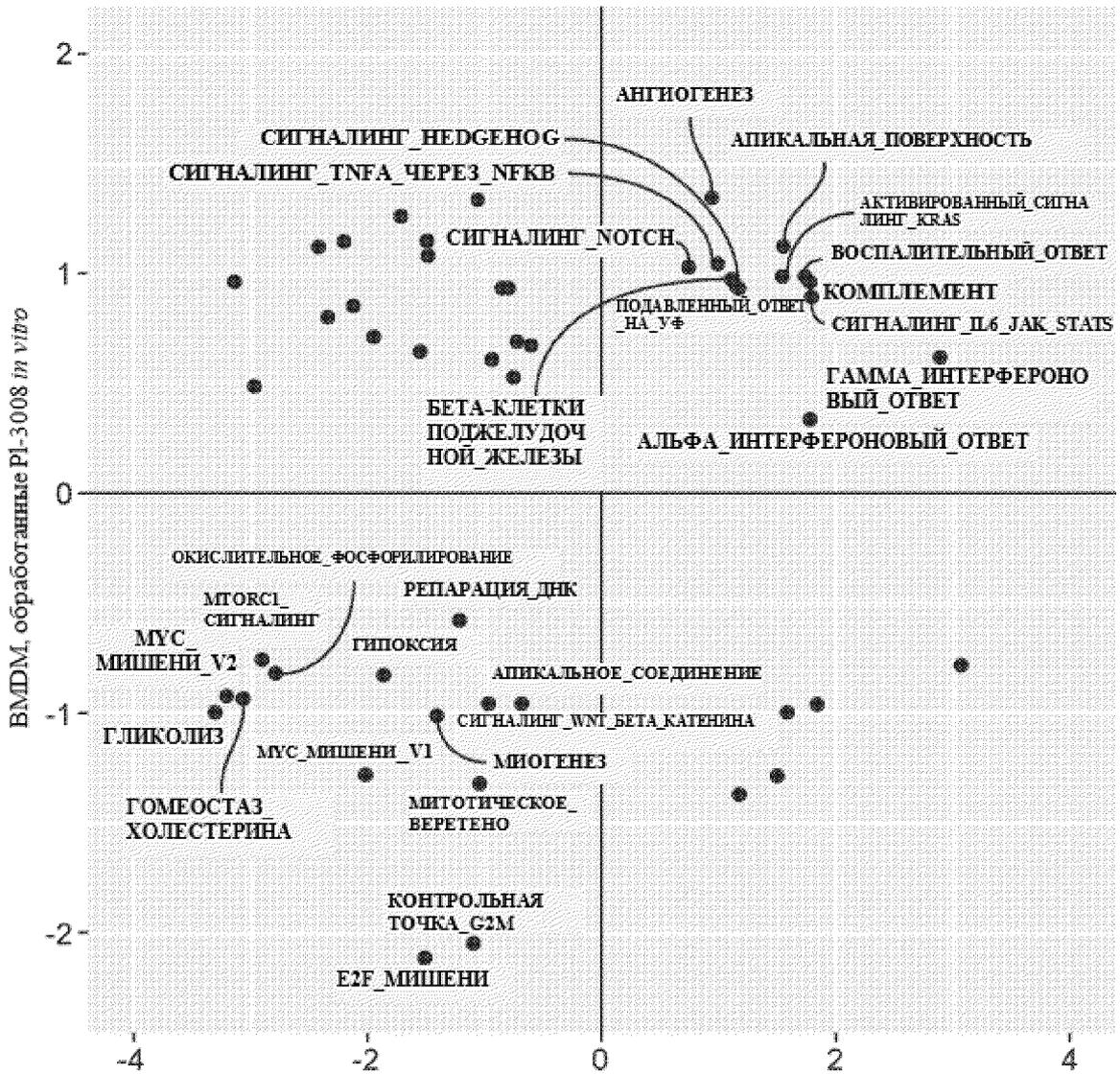


Фиг. 15С





Фиг. 16А



Опухоли СТ26, обработанные P1-3008 *in vivo*

Фиг. 16В

Фиг. 17А

SEQ	10	20	30	40	50
AbM	10	20	30	40	50 a
3061	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLS	CAAS KFTFSNYGMN	WIRQAPKKGLEWIA	LIYYNSNNKY
		* * *		* * **	
3-23*04	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLS	CAAS GFTFSSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	AISGSGGSTY
h3061-H1	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLS	CAAS KFTFSNYGMN	WVRQAPGKGLEWVS	LIYYNSNNKY
h3061-H2	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLS	CAAS KFTFSNYGMN	WIRQAPGKGLEWIA	LIYYNSNNKY
h3061-H3	EVQLVESGGGLVQP	GGSLRLS	CAAS GFTFSSYGMN	WIRQAPGKGLEWIA	LIYYNSNNKY
			#		@ ##

SEQ	60	70	80	90	100	110	120
AbM	60	70	80 abc	90			110
3061	YADSVKGRFTISR	DNSKNTLYL	EMNSLRSED	TAMYYCAK	SLTGGSDYFDS	WGQGVMTVSS	
			* * *			**	
3-23*04	YADSVKGRFTISR	DNSKNTLYL	QMNSLRAED	TAVYYCAK		WGQGLTVTVSS	
h3061-H1	YADSVKGRFTISR	DNSKNTLYL	QMNSLRAED	TAVYYCAK	SLTGGSDYFDS	WGQGLTVTVSS	
h3061-H2	YADSVKGRFTISR	DNSKNTLYL	QMNSLRAED	TAVYYCAK	SLTGGSDYFDS	WGQGLTVTVSS	
h3061-H3	YADSVKGRFTISR	DNSKNTLYL	QMNSLRAED	TAVYYCAK	SLTGGSDYFDS	WGQGLTVTVSS	
				M		V	

@ замены путем образования изоаспартата: S/Q/A

замены путем дезамидирования аспарагина: Q/S/A

Фиг. 17В

SEQ	10	20	30	40	50
AbM	10	20	30	40	50
3061	DVQMTQSPSYLAAS	PGESVSISC	KASKSIGTFLA	WYQEKPEKTNKLLIY	SGSTLQS
	*	* * * * *		* * **	
1-39*01	DIQMTQSPSSLSAS	VGDRVITC	RASQSISSYLN	WYQQKPGKAPKLLIY	AASSLQS
h3061-L1	DIQMTQSPSSLSAS	VGDRVITC	KASKSIGTFLA	WYQQKPGKAPKLLIY	SGSTLQS
	V		K	E TN	

SEQ	60	70	80	90	100
AbM	60	70	80	90	100
3061	GTPSRFSGSGGTD	PFTLTIRNLE	PEDFAVYYC	QQHDEYPFT	FGSGTKLEIK
	*	** * *	*		*
1-39*01	GVPSRFSGSGGTD	PFTLTISSLQ	PEDFATYYC	QQSYSTPP	FGQGTKLEIK
h3061-L1	GVPSRFSGSGGTD	PFTLTISSLQ	PEDFATYYC	QQHDEYPFT	FGQGTKLEIK
	T				

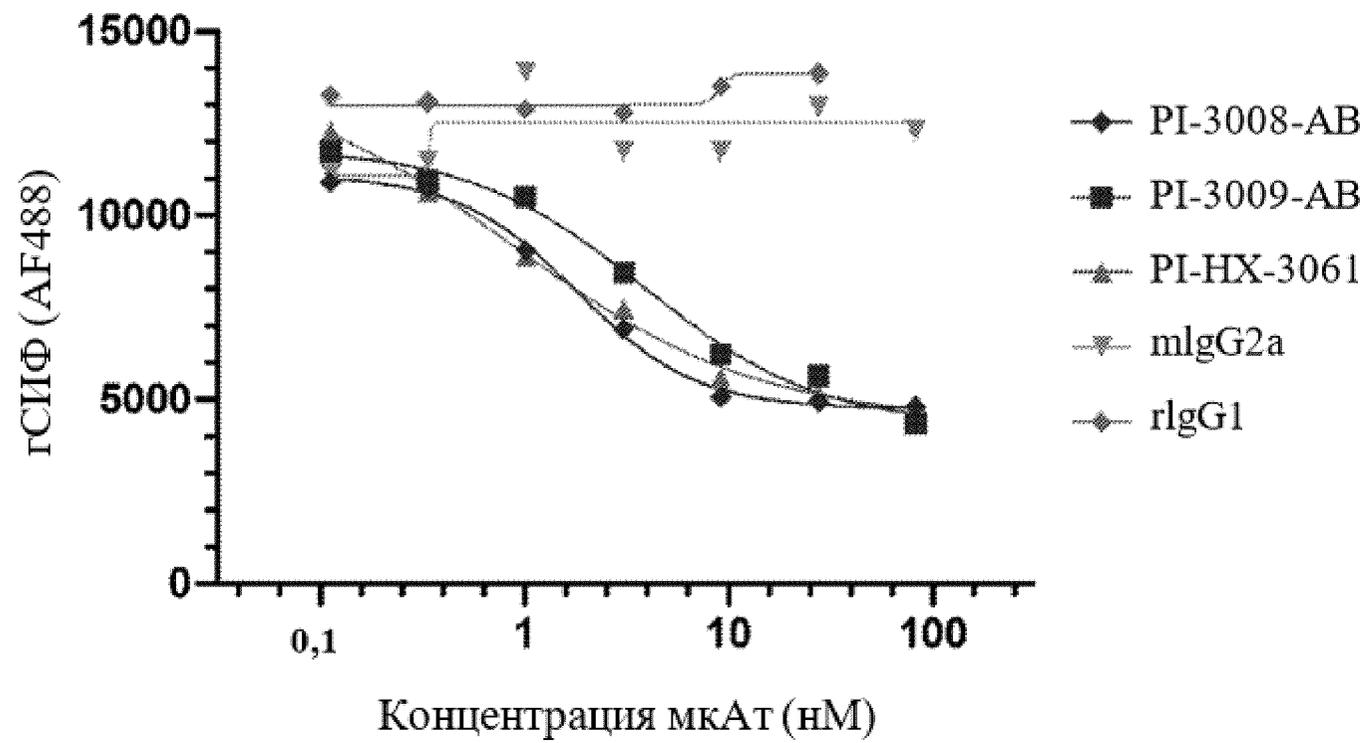
Фиг. 18

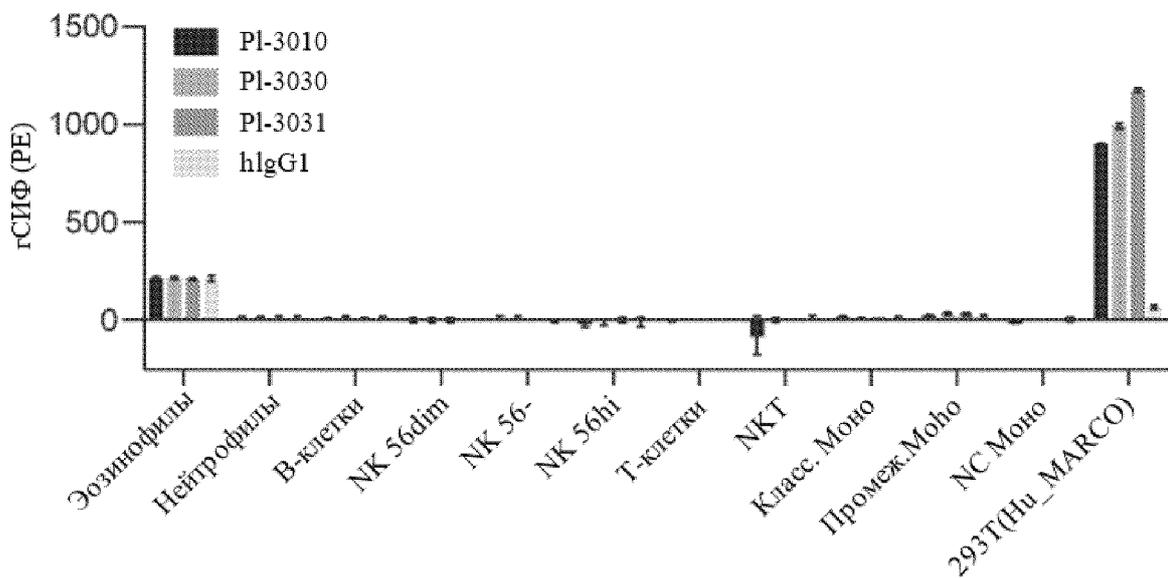
SEQ	10	20	30	40	50
AbM	10	20	30	40	50
	b b b	p p	b b b	b b	bi bi i ii ibbi
3031	DIQMTQSPASLSTSLGETVSI	EC	LASEGISNDLA	WYQQKSGKSPQLLIY	AA
		* * * * *		* * *	
1-39*01	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPGKAPKLLIY	AA	
h3031-L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASEGISNDLA	WYQQKPGKAPKLLIY	AA	
h3031-L2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASEGISNDLA	WYQQKPGKAPKLLIY	AA	
h3031-L3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASEGISNDLA	WYQQKPGKAPKLLIY	AA	
h3031-L2b	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASEGISNDLA	WYQQKPGKAPKLLIY	AA	
h3031-L2c	DIQMTQSPSSLSSTSVGDRVTITC	RASEGISNDLA	WYQQKPGKSPKLLIY	AA	
h3031-L2d	DIQMTQSPSSLSSTSVGDRVTITC	RASEGISNDLA	WYQQKPGKSPKLLIY	AA	
		T	L	#	S

SEQ	60	70	80	90	100
AbM	60	70	80	90	100
	b b	b b b	b	ib bib	ibii-ib i b b b
3031	GVPSRFSGSGSGTRYSLKISGMQPEDEADYFC	QOSYKYPLT	FGSGTKLEIK		
		*** * **	* * *		*
1-39*01	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QOSYSTPP	FGQGTKLEIK		
h3031-L1	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QOSYKYPLT	FGQGTKLEIK		
h3031-L2	GVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYC	QOSYKYPLT	FGQGTKLEIK		
h3031-L3	GVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYC	QOSYKYPLT	FGQGTKLEIK		
h3031-L2b	GVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYC	QOSYKYPLT	FGQGTKLEIK		
h3031-L2c	GVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYFC	QOSYKYPLT	FGQGTKLEIK		
h3031-L2d	GVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYFC	QOSYKYPLT	FGQGTKLEIK		
		E	F		

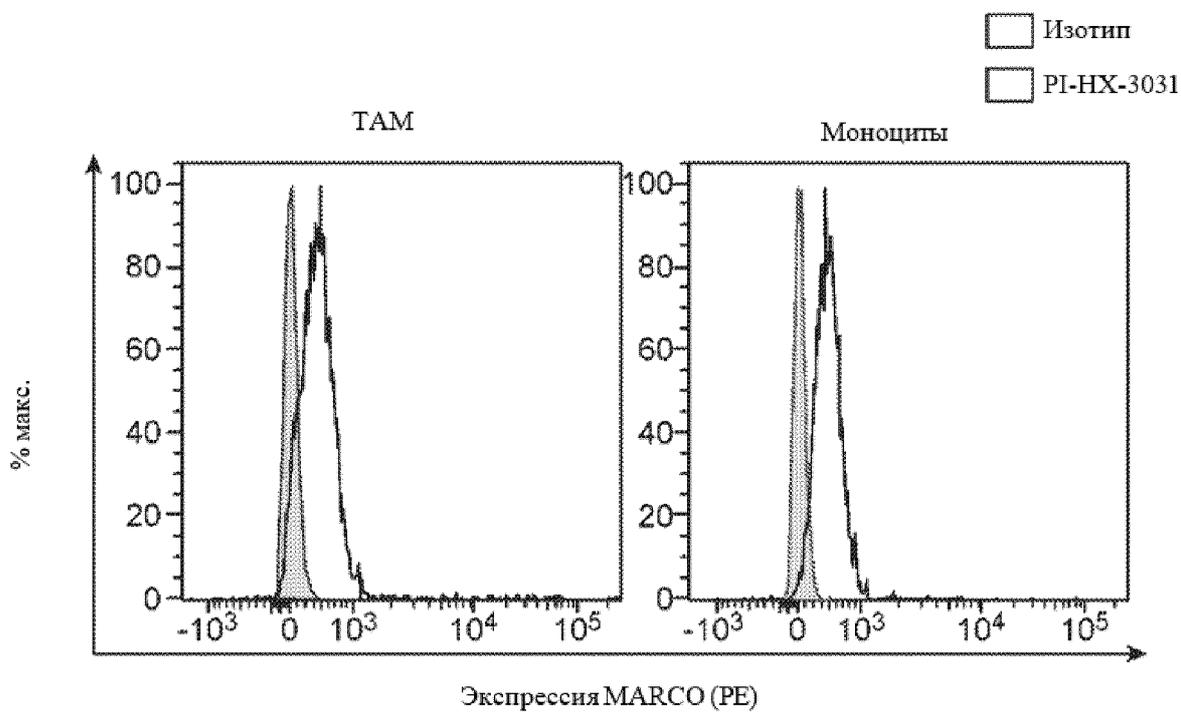
замены путем дезамидирования: Q/S/A/D

Фиг. 19





Фиг. 20А



Фиг. 20В

Фиг. 21

человек_MARCO_SRCR
мышинный_MARCO_SRCR

NSVSVRIVGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDEWQNSDAIVFCRMLGYSKGRALYKVGAGTGQIWLDNVQCRGTESLWDCSKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV
SFQVRVIMGGTNRGRAEVYNNNEWGTICDDDWQNSDATVFCRMLGYSRGRALSSYGGGSGNIWLDNVNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS-
**** ** *** * * * * * ** * * * * *

мышинный_вариант1
мышинный_вариант2
мышинный_вариант3
мышинный_вариант4
мышинный_вариант5
мышинный_вариант6
мышинный_вариант7

SFQVRVIMGGTNRGRAEVYYSGTWGTICDDDWQNSDATVFCRMLGYSRGRALSSYGGGSGNIWLDNVNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS-
SFQVRVIMGGTNRGRAEVYNNNEWGTICDDEWQNSDATVFCRMLGYSKGRALSSYGGGSGNIWLDNVNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS-
SFQVRVIMGGTNRGRAEVYNNNEWGTICDDDWQNSDATVFCRMLGYSRGRALYKYGGGSGNIWLDNVNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS-
SFQVRVIMGGTNRGRAEVYNNNEWGTICDDDWQNSDATVFCRMLGYSRGRALSSYGGGSGNIWLDNVNCRGTESLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS-
SFQVRVIMGGTNRGRAEVYNNNEWGTICDDDWQNSDATVFCRMLGYSRGRALSSYGGGSGNIWLDNVNCRGTENSLWDCSKNSWGHHDCSHEEDAGVECS-
SFQVRVIMGGTNRGRAEVYNNNEWGTICDDEWQNSDATVFCRMLGYSRGRALSSYGGGSGNIWLDNVQCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS-
NSVSVRIVGSSNRGRAEVYNNNEWGTICDDDWQNSDATVFCRMLGYSRGRALSSYGGGSGNIWLDNVNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS-

человек_MARCO_SRCR
мышинный_MARCO_SRCR

NSVSVRIVGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDEWQNSDAIVFCRMLGYSKGRALYKVGAGTGQIWLDNVQCRGTESLWDCSKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV
SFQVRVIMGGTNRGRAEVYNNNEWGTICDDDWQNSDATVFCRMLGYSRGRALSSYGGGSGNIWLDNVNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS-
**** ** *** * * * * * ** * * * * *

человек_вариант 1
человек_вариант 2
человек_вариант 3
человек_вариант 4
человек_вариант 5
человек_вариант 6
человек_вариант 7

NSVSVRIVGSSNRGRAEVYNNNEWGTICDDEWQNSDAIVFCRMLGYSKGRALYKVGAGTGQIWLDNVQCRGTESLWDCSKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV
NSVSVRIVGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDDWQNSDAIVFCRMLGYSRGRALYKVGAGTGQIWLDNVQCRGTESLWDCSKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV
NSVSVRIVGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDEWQNSDAIVFCRMLGYSKGRALSSVAGTGQIWLDNVQCRGTESLWDCSKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV
NSVSVRIVGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDEWQNSDAIVFCRMLGYSKGRALYKVGAGTGQIWLDNVQCRGTENSLWDCSKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV
NSVSVRIVGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDEWQNSDAIVFCRMLGYSKGRALYKVGAGTGQIWLDNVQCRGTESLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECSV
NSVSVRIVGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDEWQNSDAIVFCRMLGYSKGRALYKVGAGTGQIWLDNVNCRGTESLWDCSKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV
SFQVRVIMGGTNRGRAEVYYSGTWGTICDDEWQNSDAIVFCRMLGYSKGRALYKVGAGTGQIWLDNVQCRGTESLWDCSKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV

450

*

человек_MARCO_SRCR
мышинный_MARCO_SRCR

NSVSVRIVGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDEWQNSDAIVFCRMLGYSKGRALYKVGAGTGQIWL^QLDNVQCRGTESTLW^SCTKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV
SFQVRIMGGTNRGRAEVYYNNEWGTICDDW^QNDATVFCRMLGYSRGRALSSYGGGSGNIWLDNVNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNE^DAGVECS-
**** ** *** * * * * * * * * * * *

hVar3
hVar5
hVar6

NSVSVRIVGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDEW^DNSDAIVFCRMLGYSKGRALSSV^GAGTGQIWL^QLDNVQCRGTESTLW^SCTKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV
NSVSVRIVGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDEW^QNSDAIVFCRMLGYSKGRALYKVGAGTGQIWL^QLDNVQCRGTESTLW^SCTKNSWGNHNCVHNE^DAGVECSV
NSVSVRIVGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDD^DW^DNSDAIVFCRMLGYSKGRALYKVGAGTGQIWL^QLDNVNCRGTESTLW^SC^SKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV

человек_MARCO ДТ

NSVSVRIVGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDEW^QNSDAIVFCRMLGYSKGRALYKVGAGTGQIWL^QLDNVQCRGTESTLW^SCTKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV

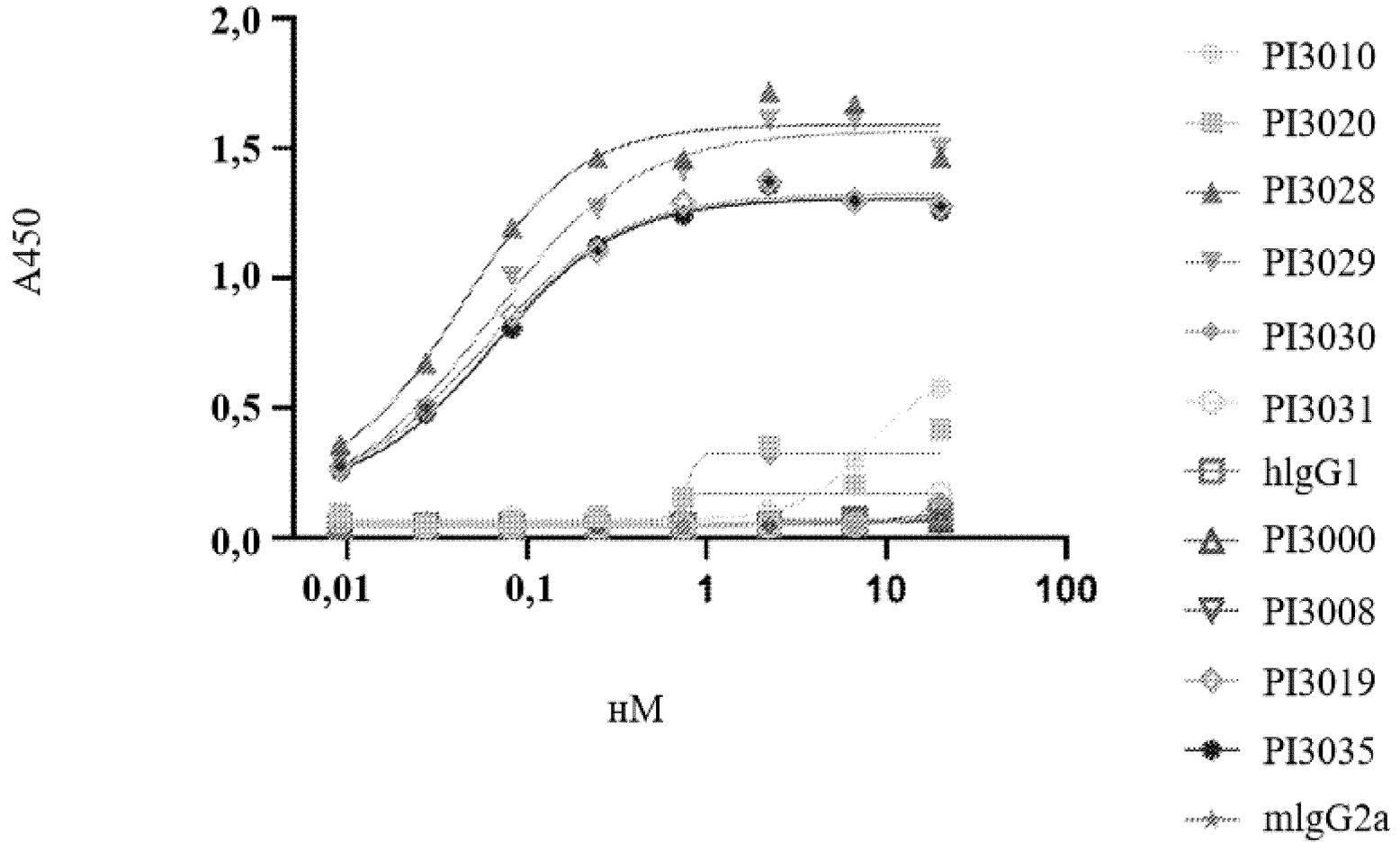
mVar6

SFQVRIMGGTNRGRAEVYYNNEWGTICDDEW^QNDATVFCRMLGYSRGRALSSYGGGSGNIWLDNVQCRGTENSLWDC^TKNSWGNHNCVHNE^DAGVECS-

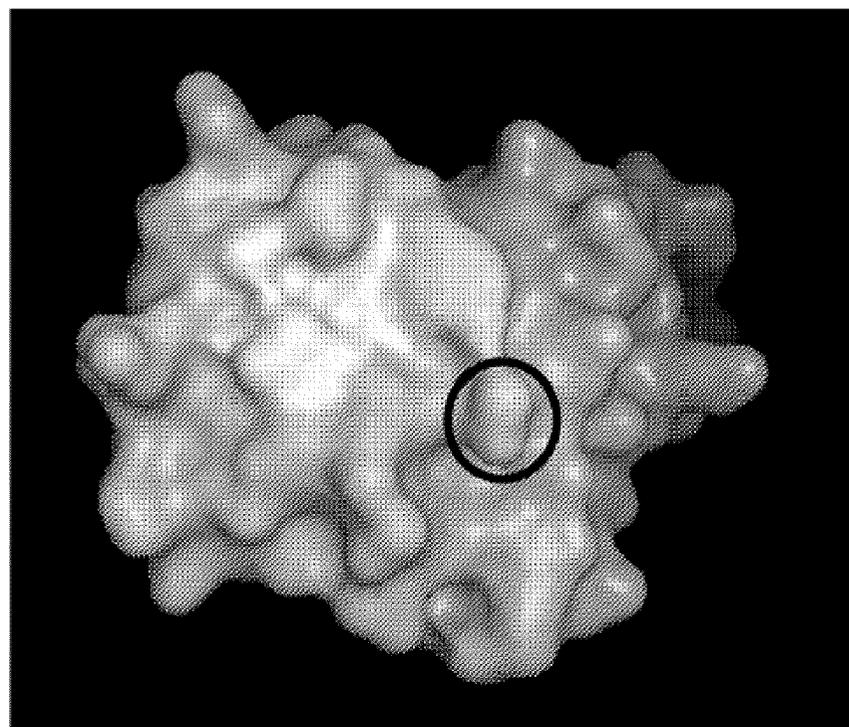
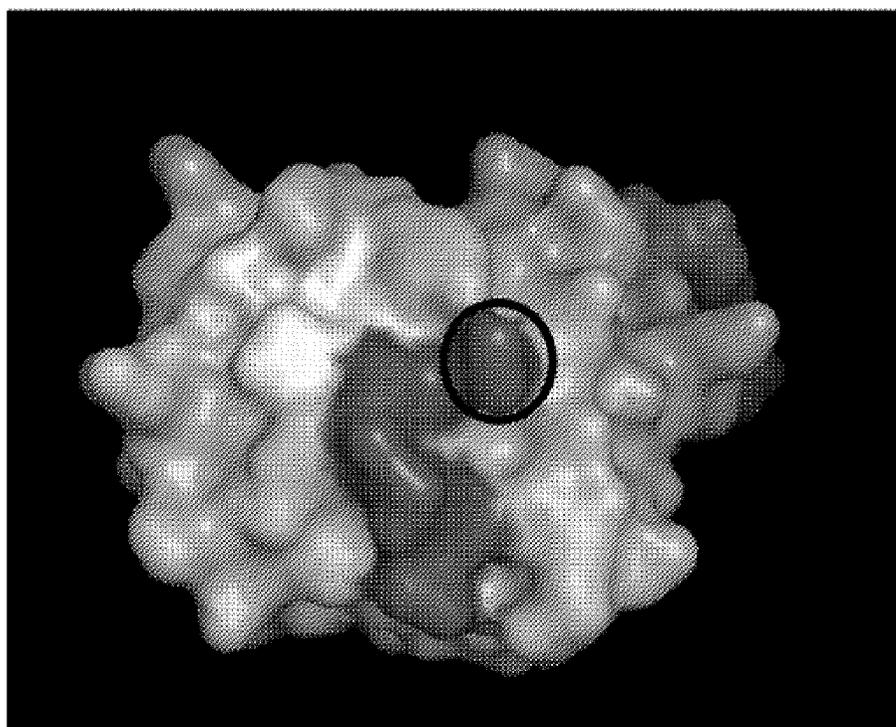
mbffiKCO ДТ

SFQVRIMGGTNRGRAEVYYNNEWGTICDD^DW^DNDATVFCRMLGYSRGRALSSYGGGSGNIWLDNVNCRGTENSLWDC^SKNSWGNHNCVHNE^DAGVECS

Фиг. 23

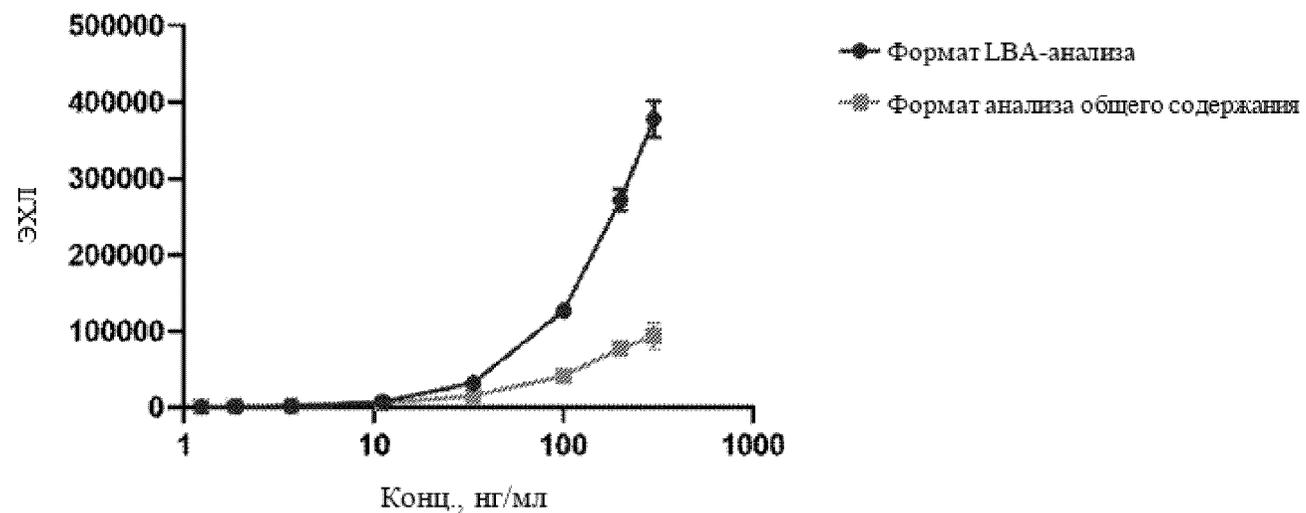


Фиг. 24



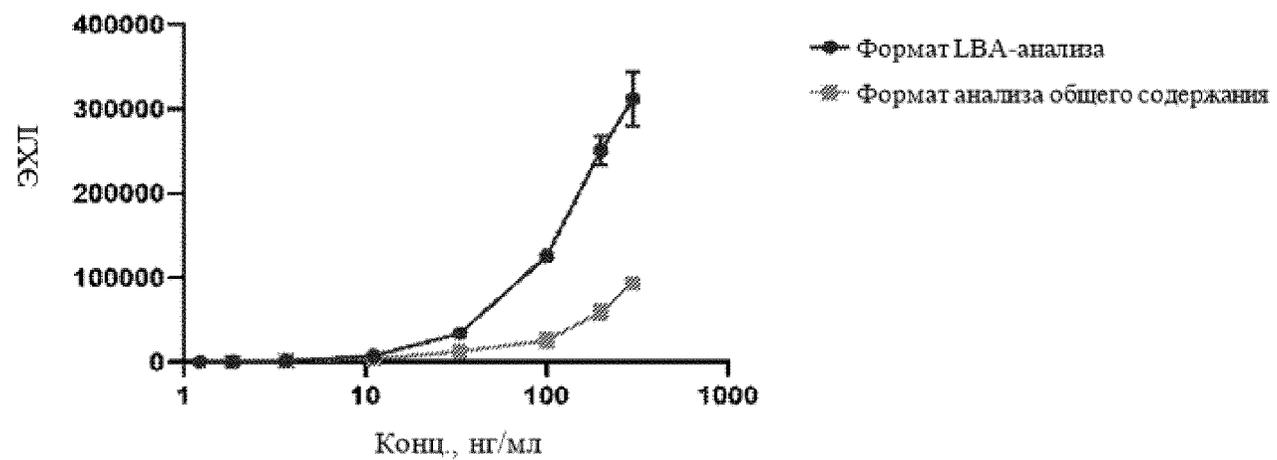
Фиг. 25А

PI-3025-AB

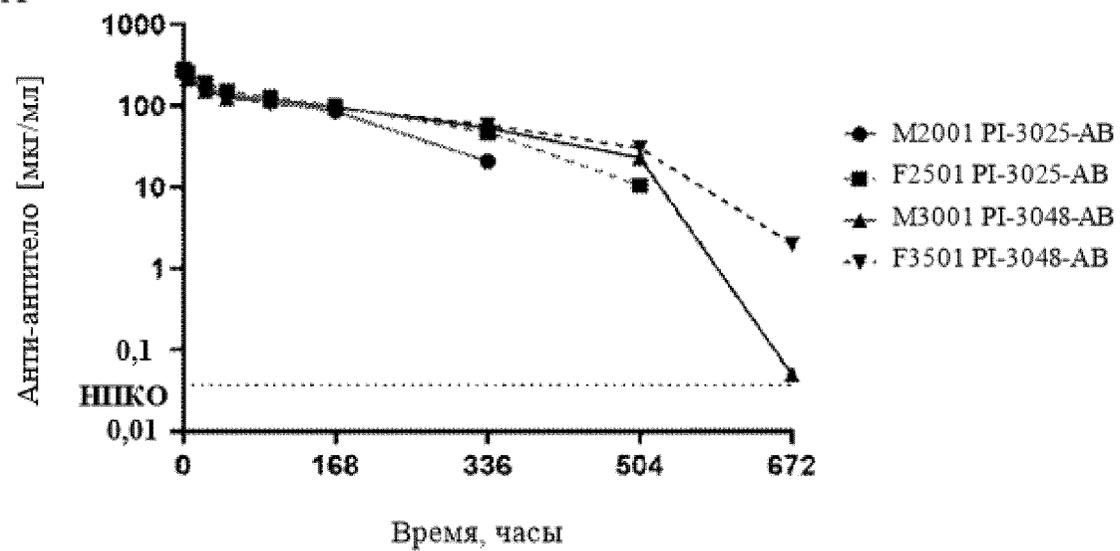


Фиг. 25В

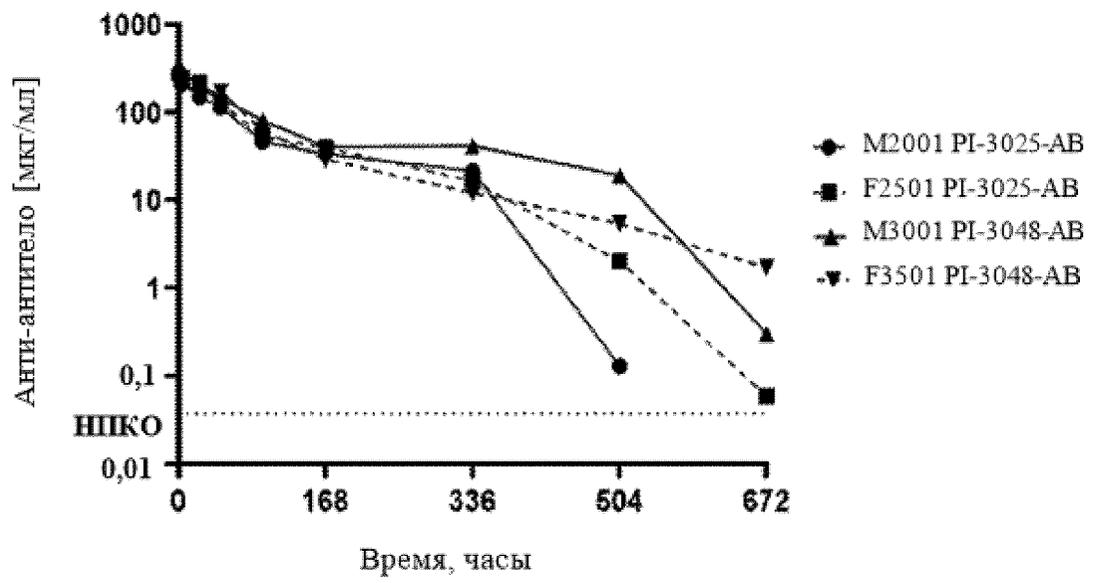
PI-3048-AB



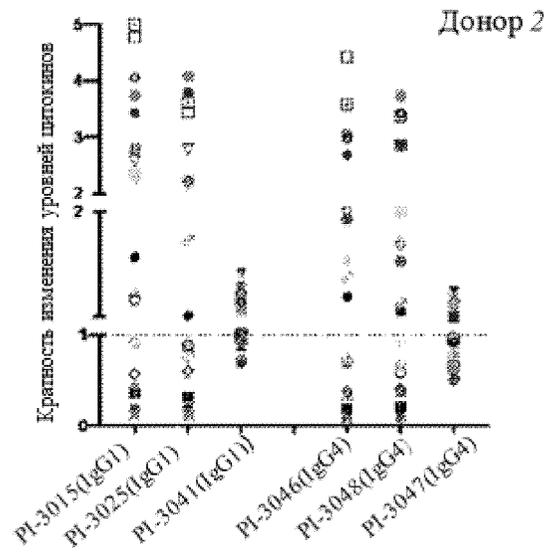
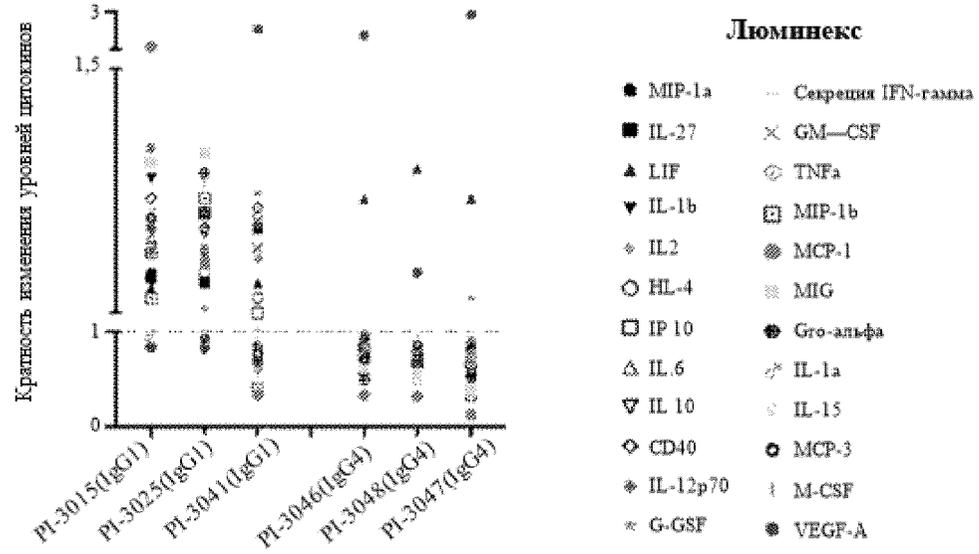
Фиг. 26А



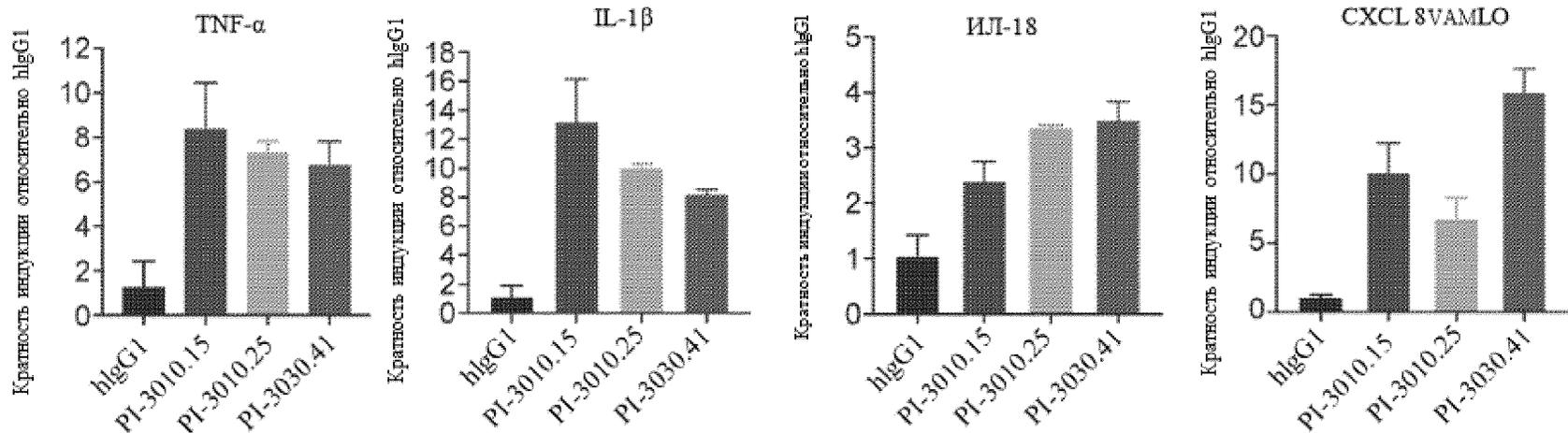
Фиг. 26В



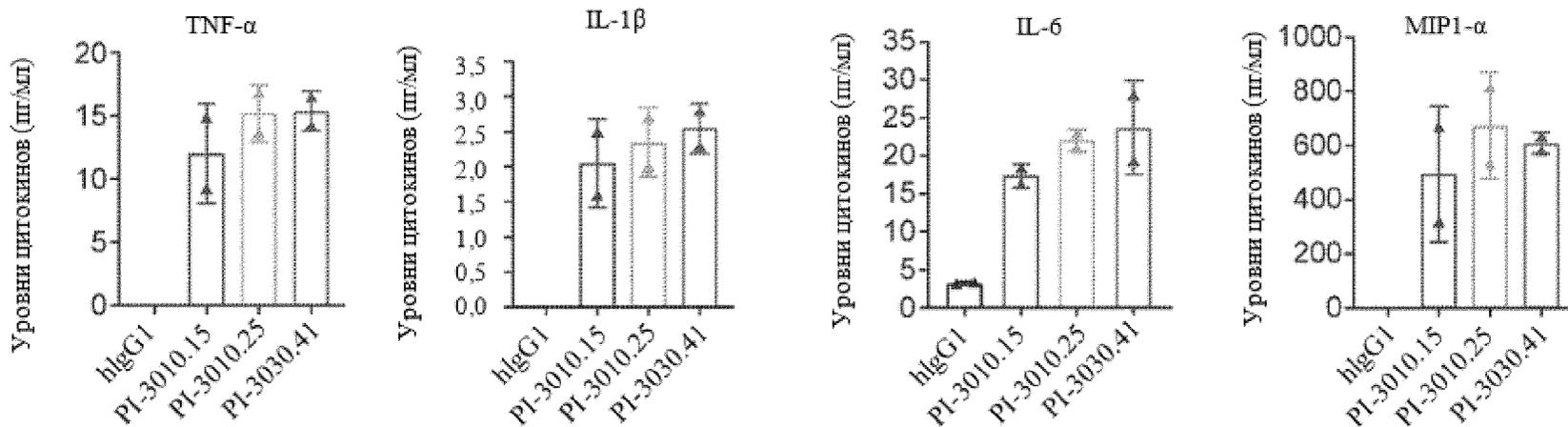
Фиг. 27 Донор 1



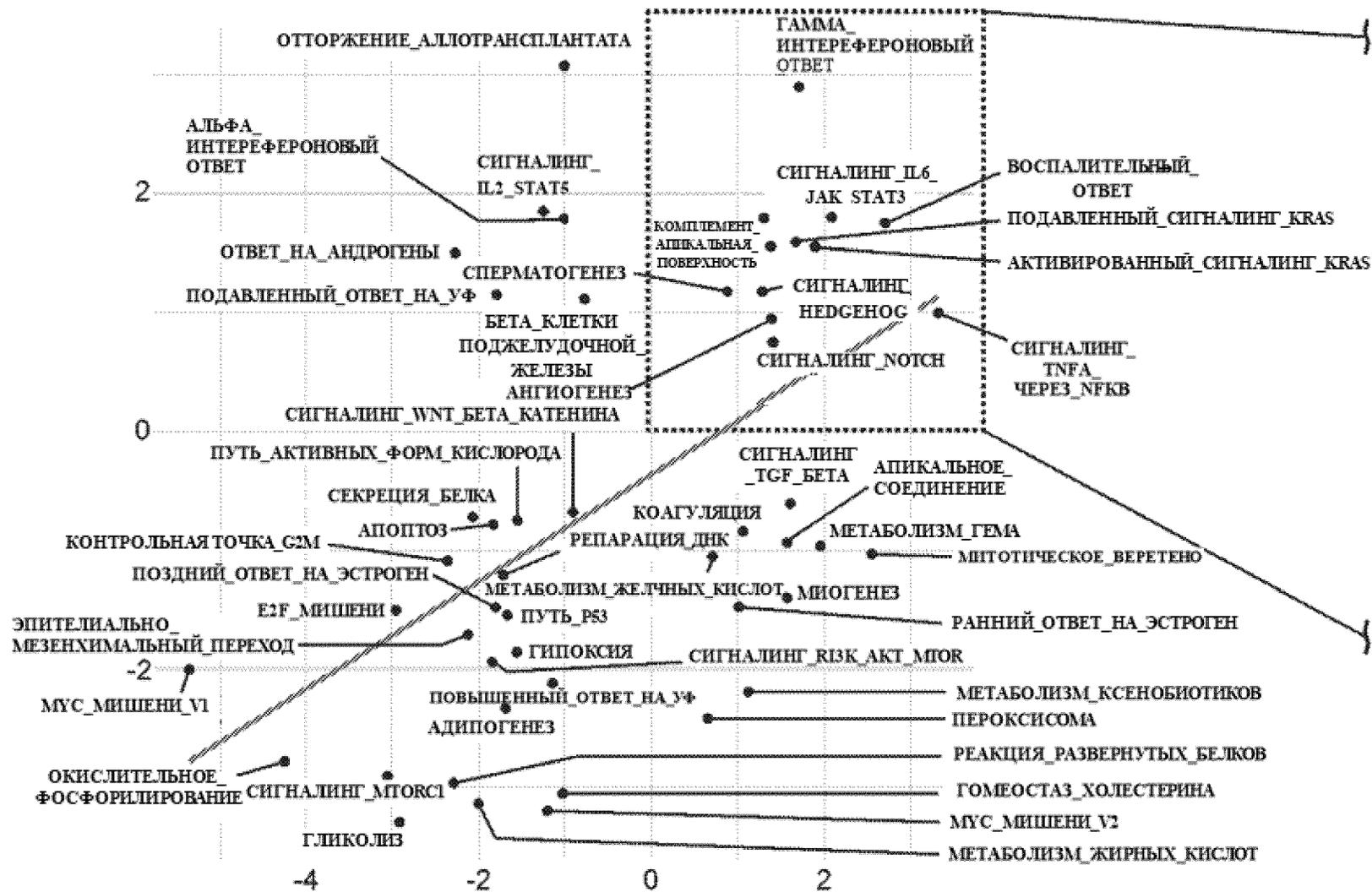
Данные по мРНК согласно КИЦР



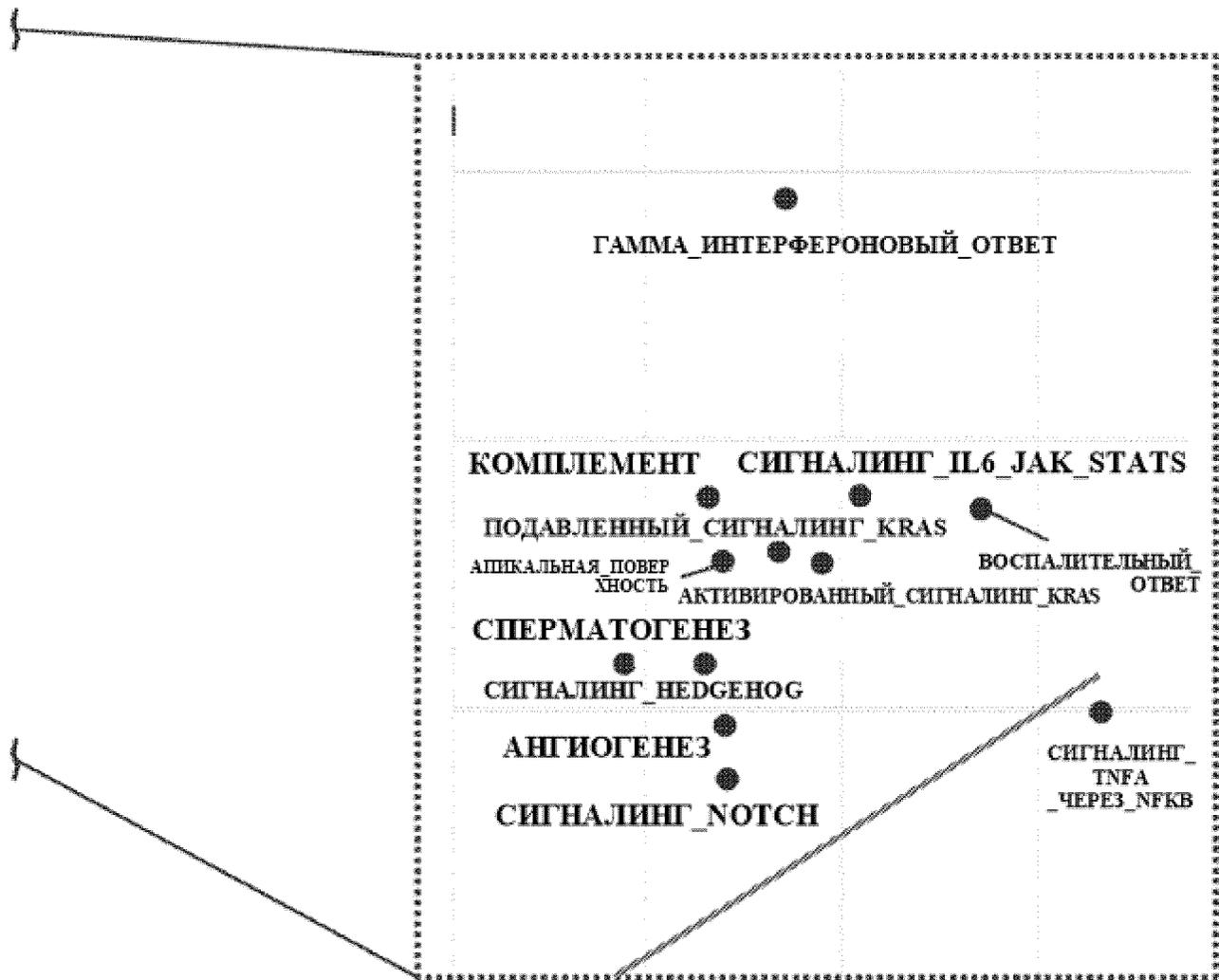
Данные по цитокинам согласно MSD



Фиг. 28



ФИГ. 29

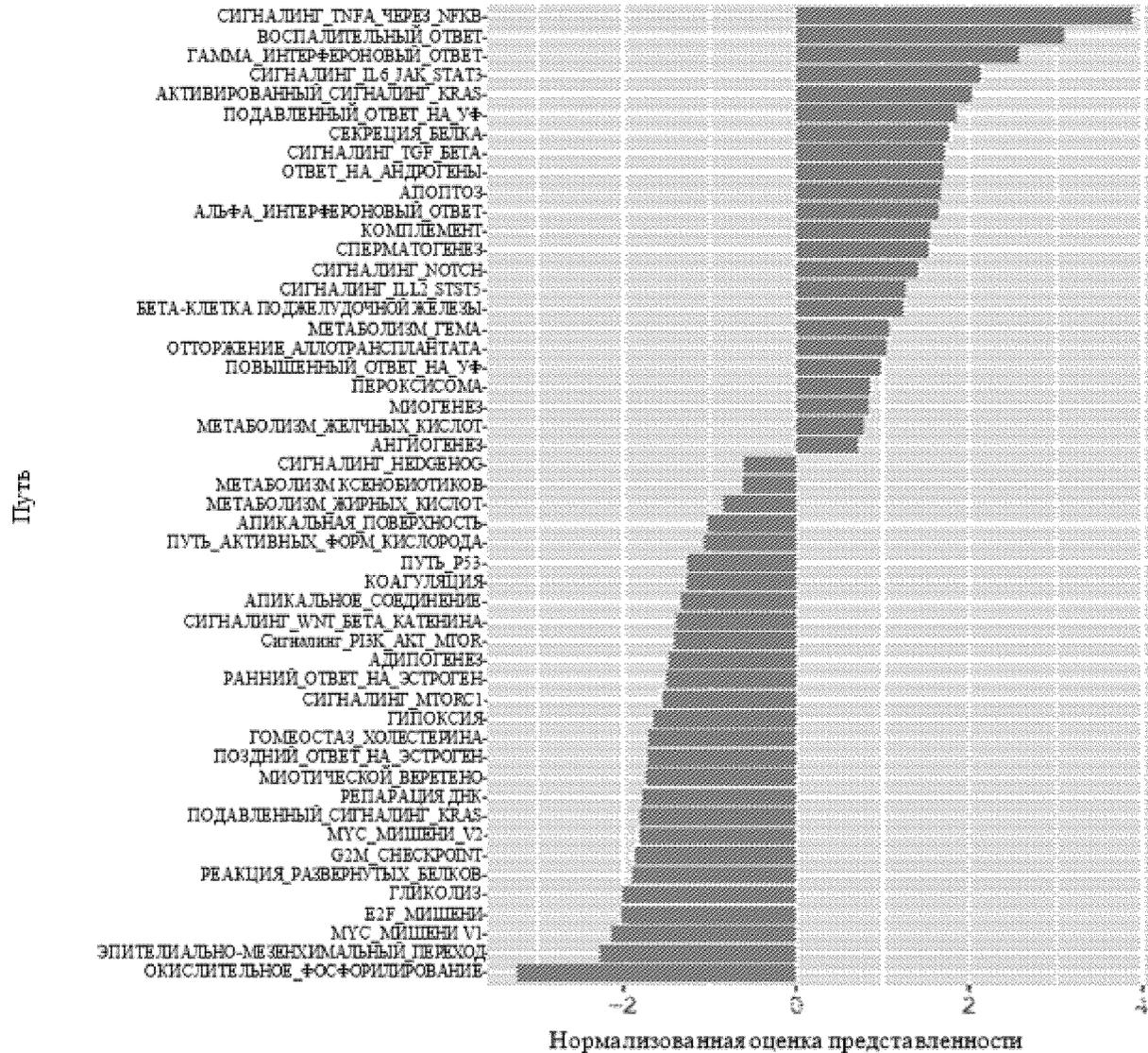


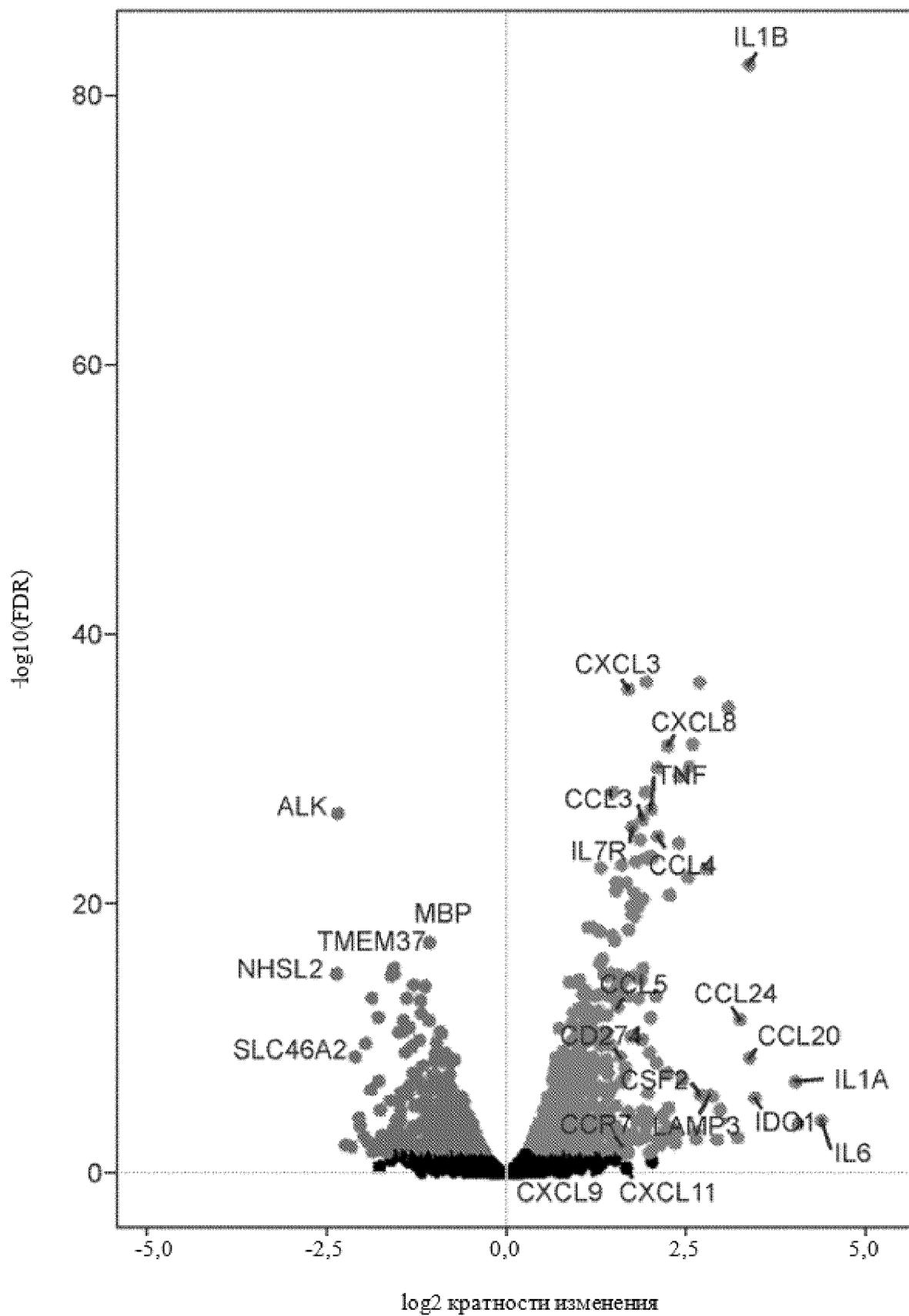
Человеческий DTC 2019: P1-3010 и контроль (*in vitro*)

ST26 мыши: P1-3008 и контроль (*in vivo*)

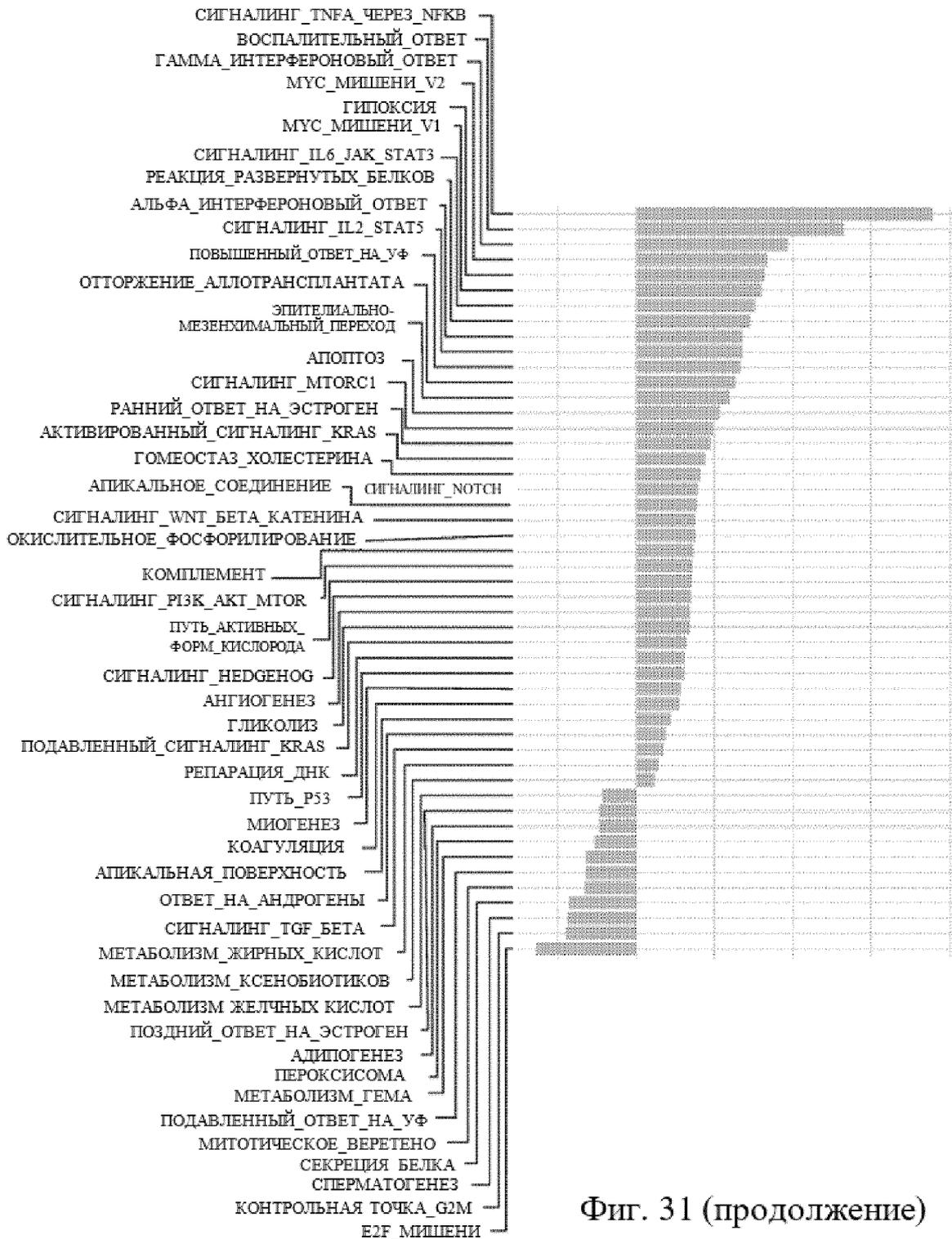
Фиг. 29 (продолжение)

Фиг. 30

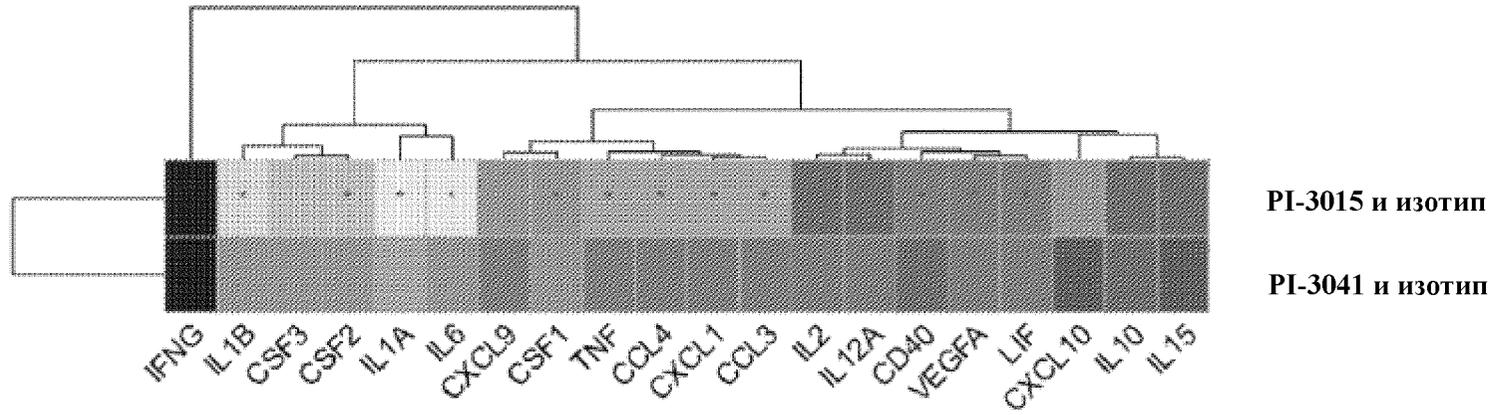




Фиг. 31

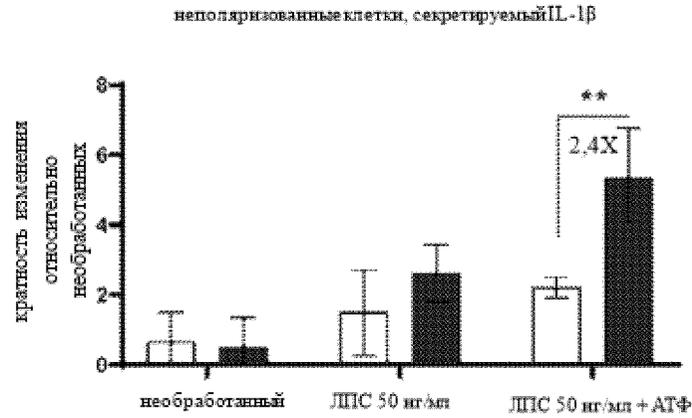


Фиг. 32

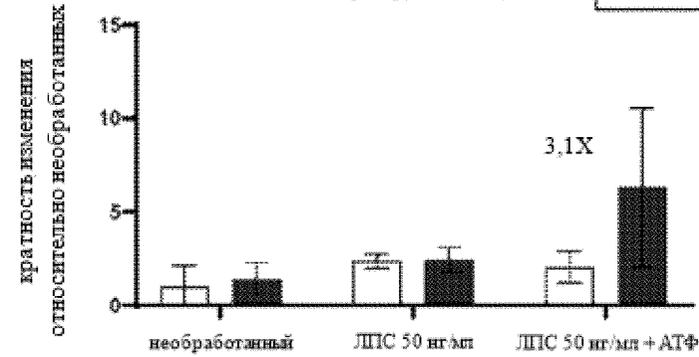


Фиг. 33А

C57BL/6

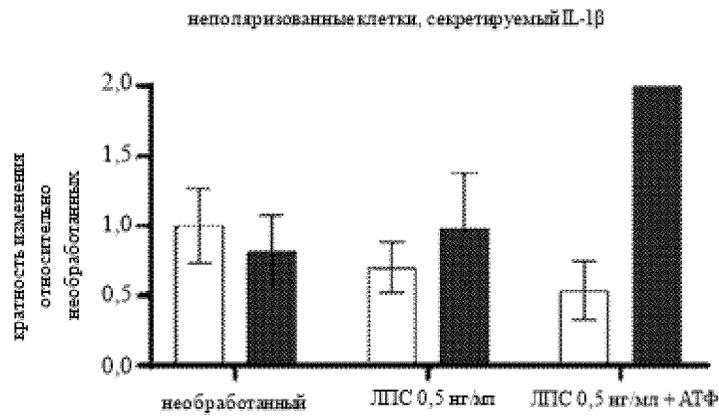


Фиг. 33В

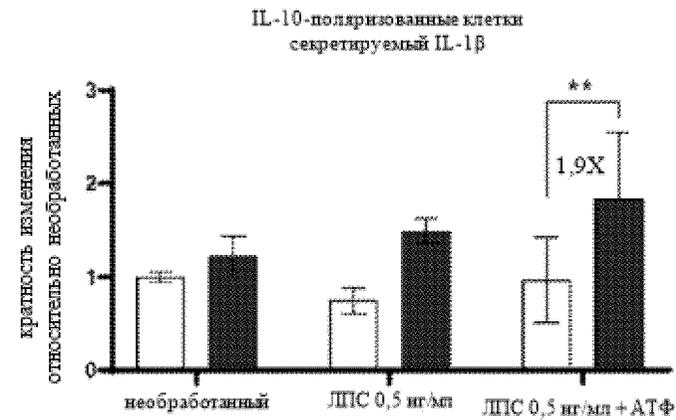


Фиг. 33С

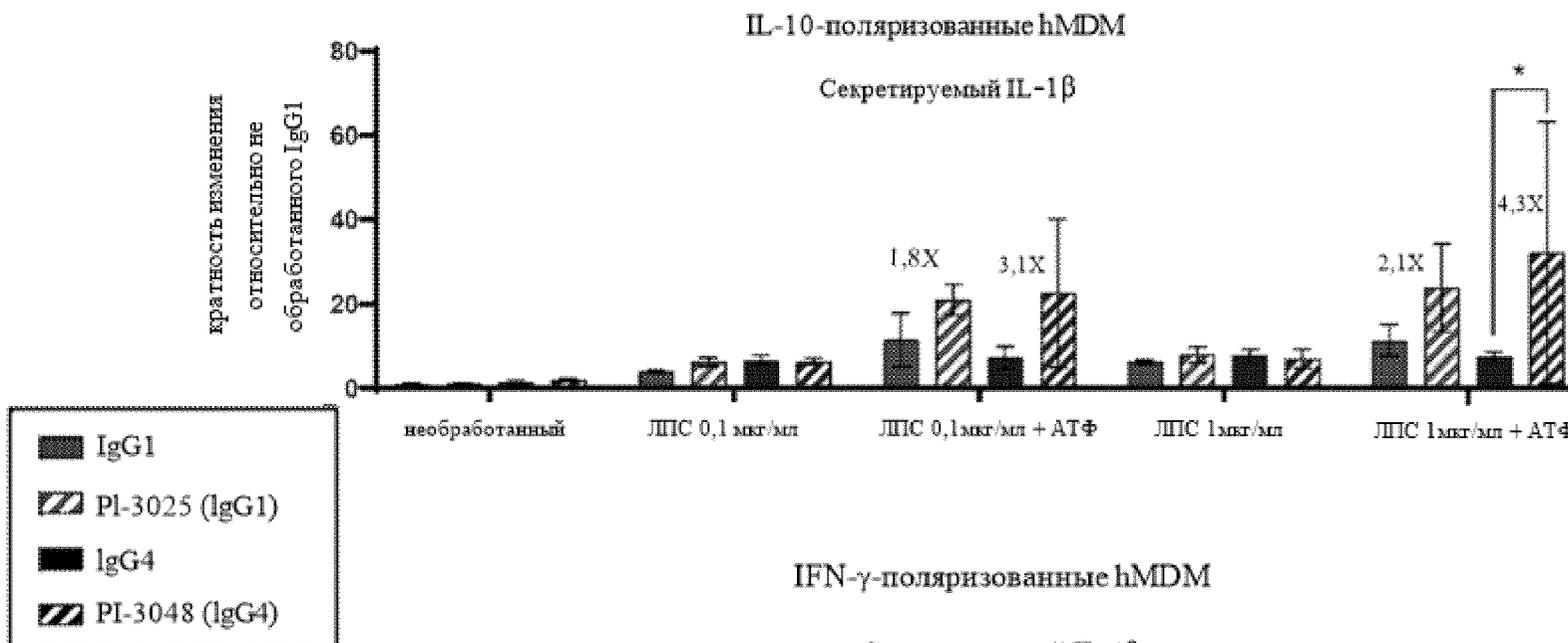
Balb/c



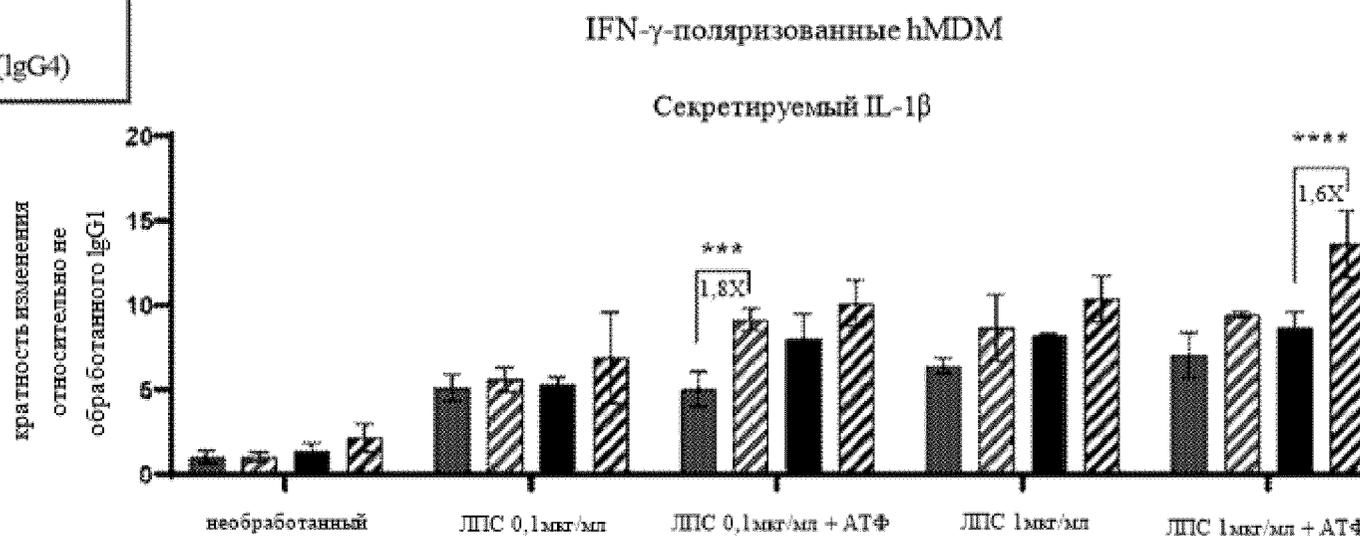
Фиг. 33D



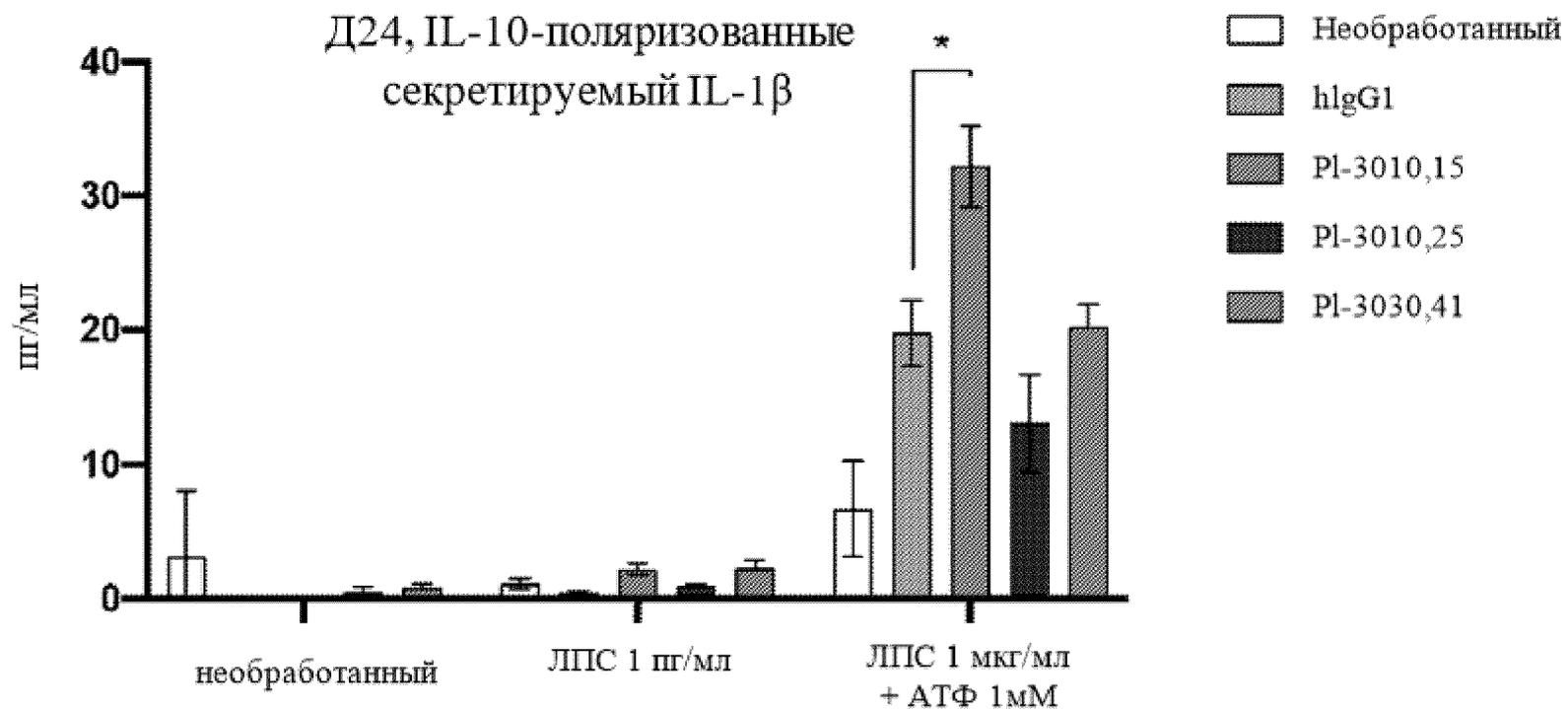
Фиг. 34А



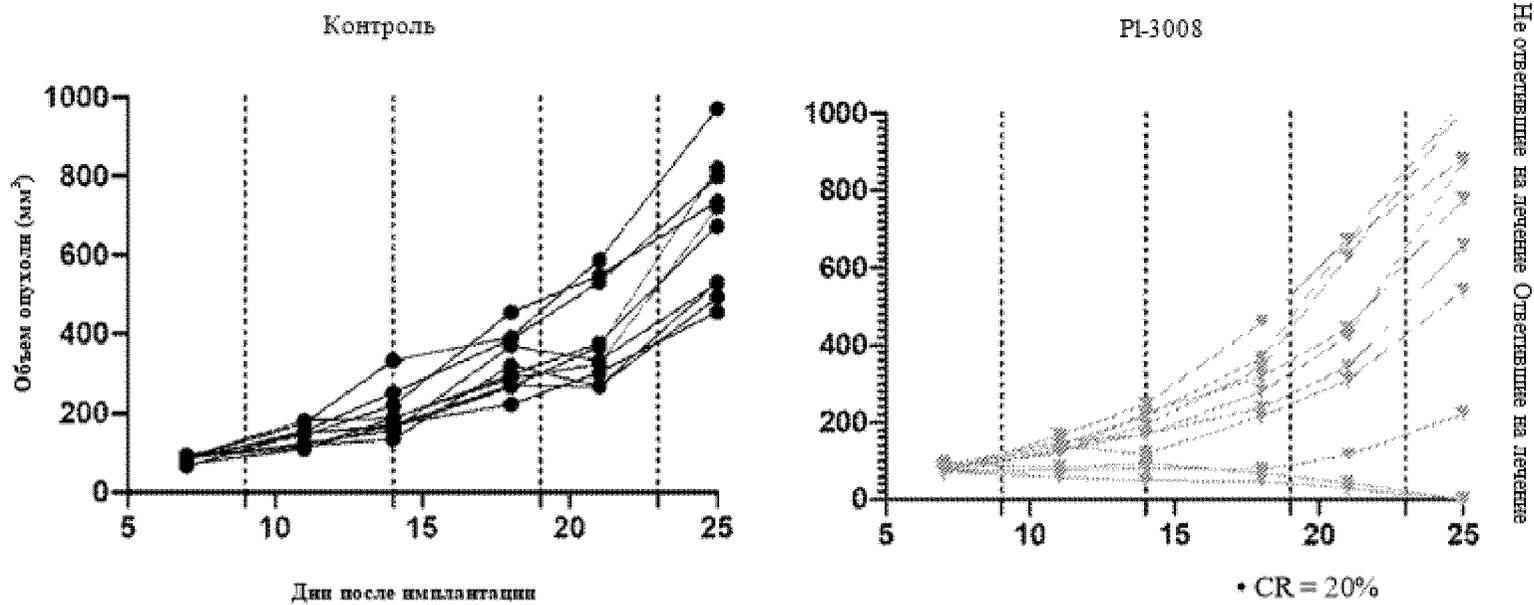
Фиг. 34В



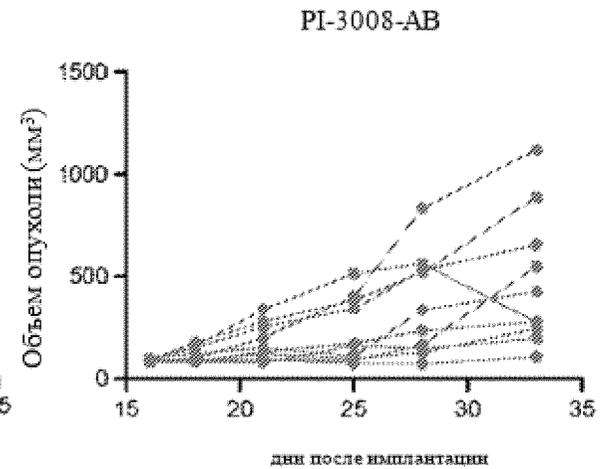
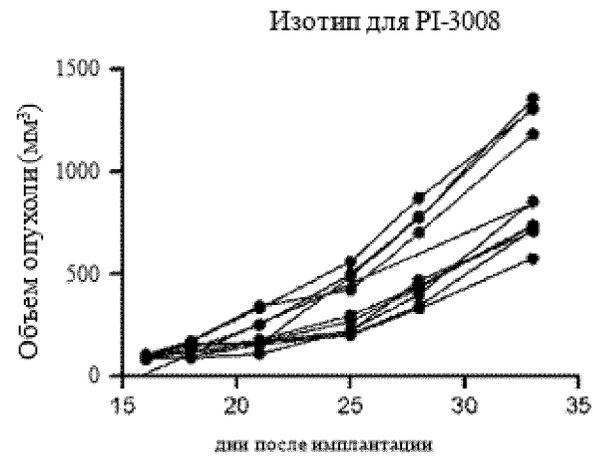
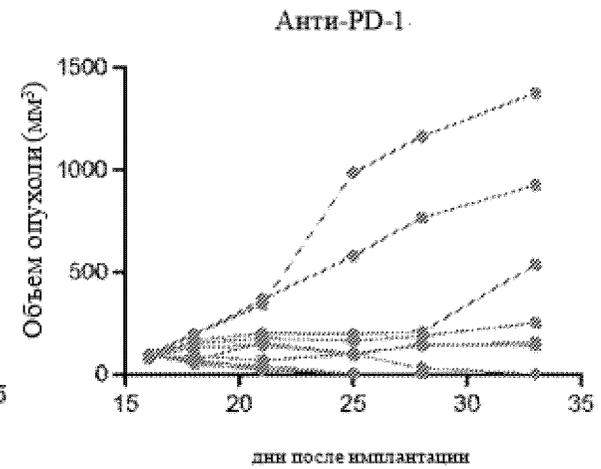
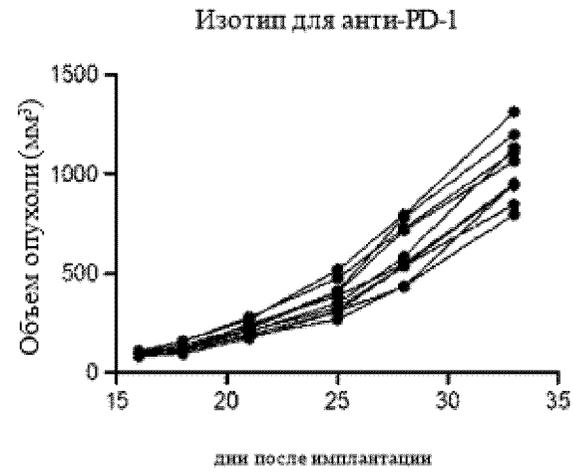
Фиг. 35



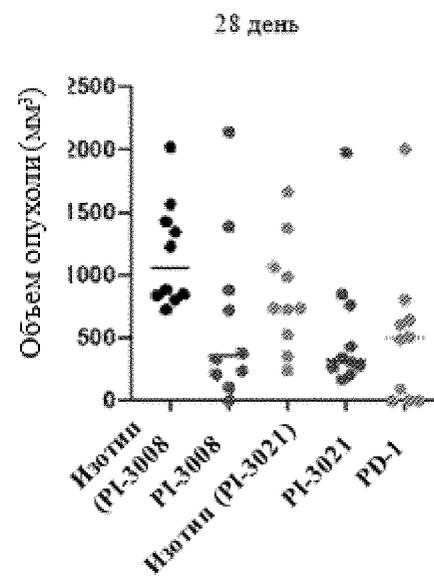
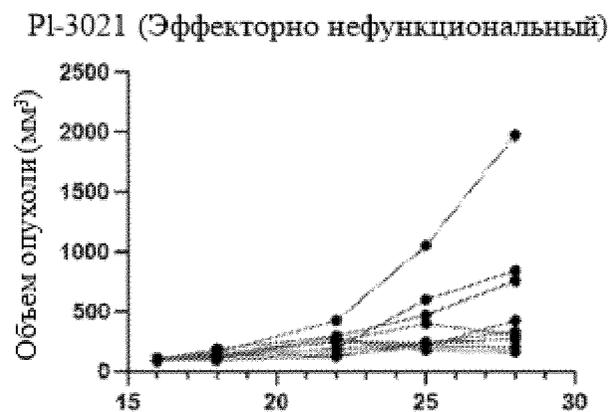
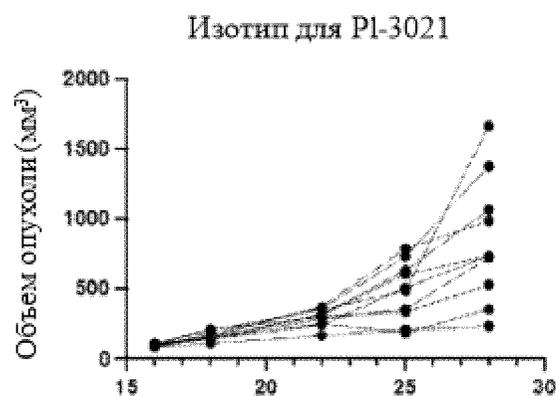
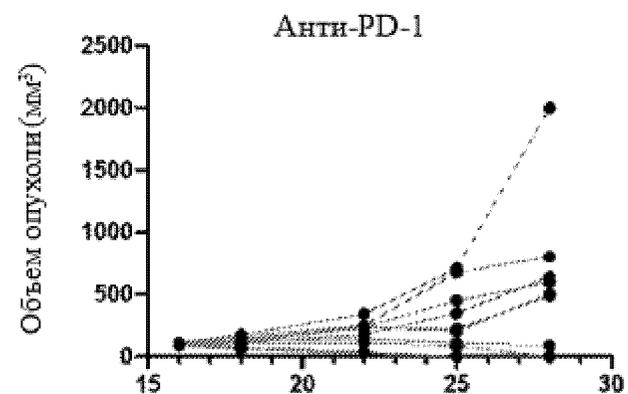
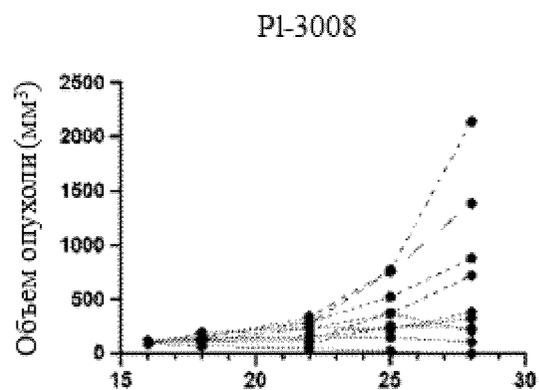
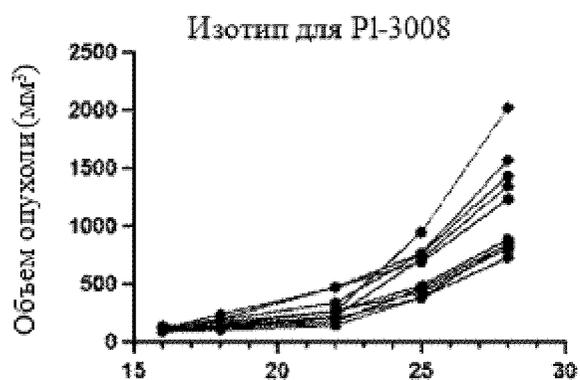
Фиг. 36



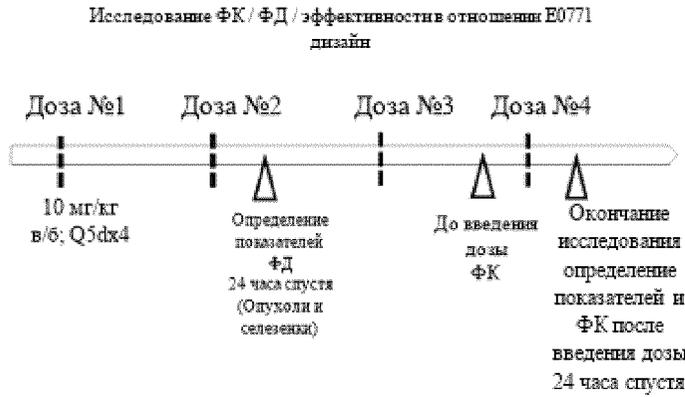
Фиг. 37



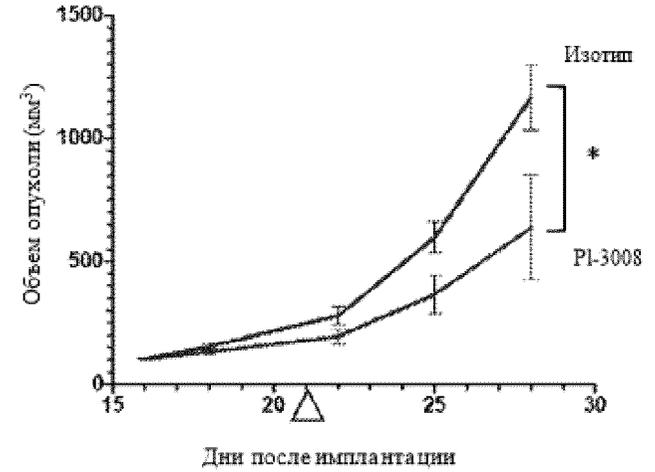
Фиг. 38С



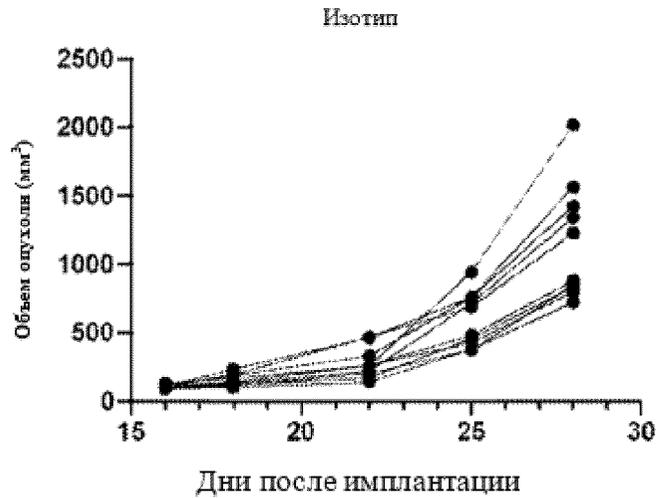
Фиг. 39А



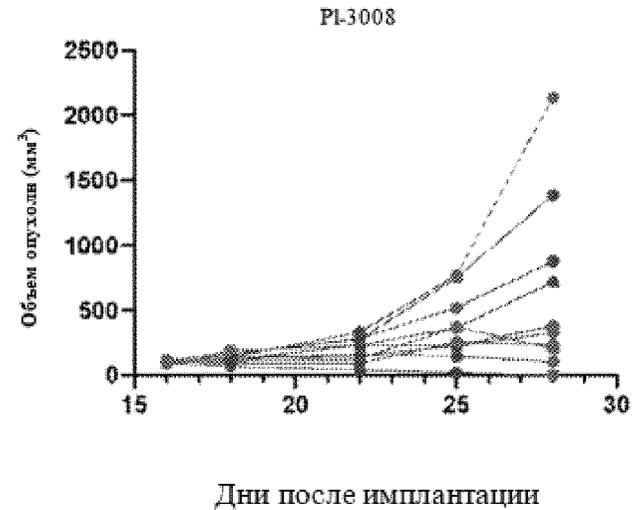
Фиг. 39В

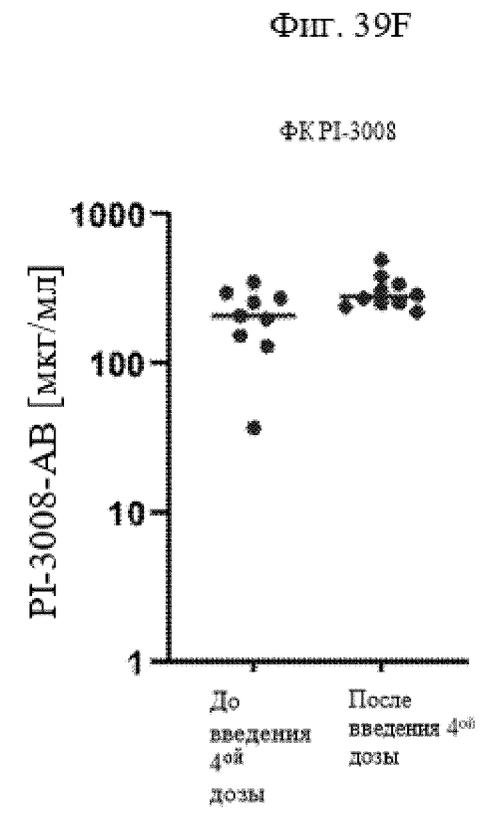
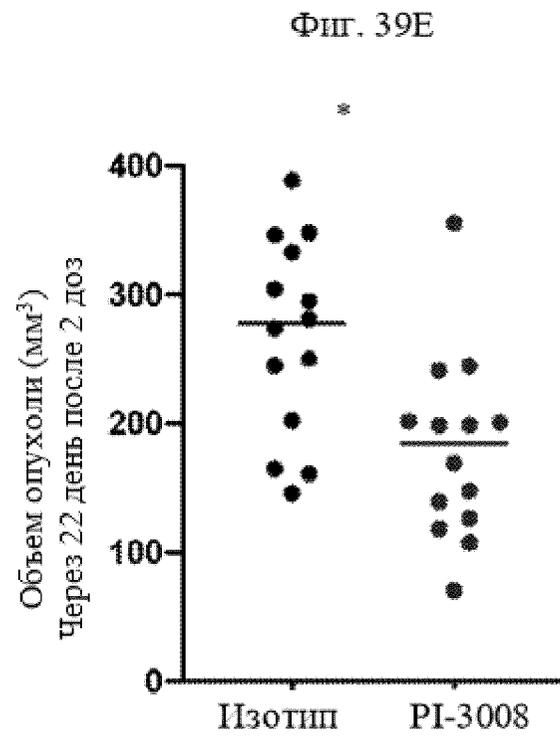


Фиг. 39С



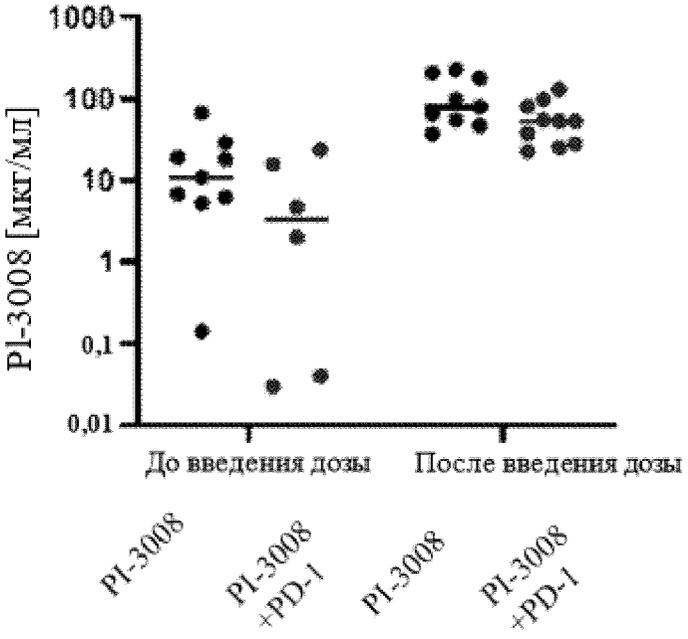
Фиг. 39D





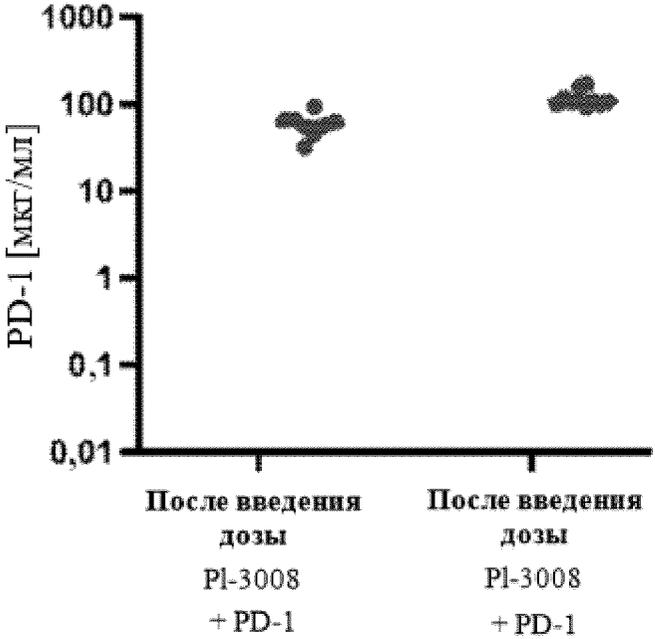
Фиг. 40А

ФК PI-3008

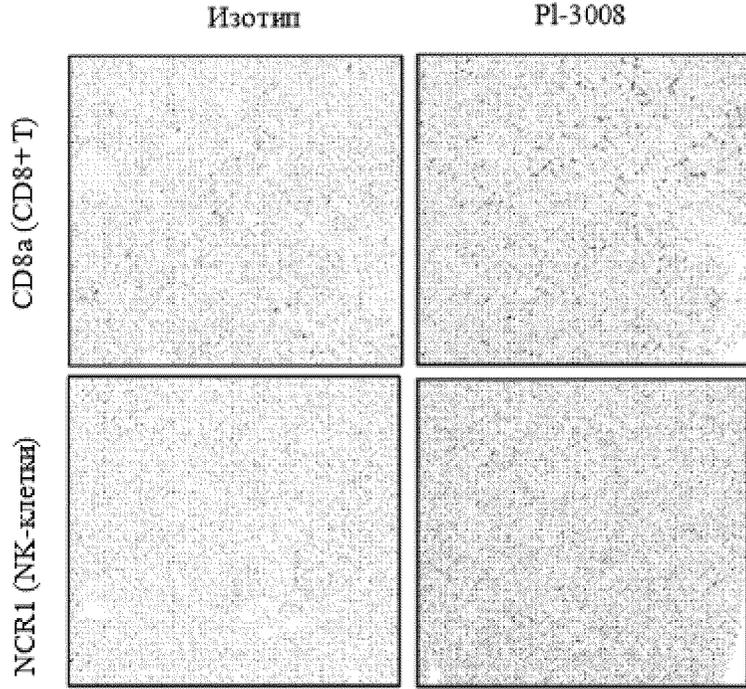


Фиг. 40В

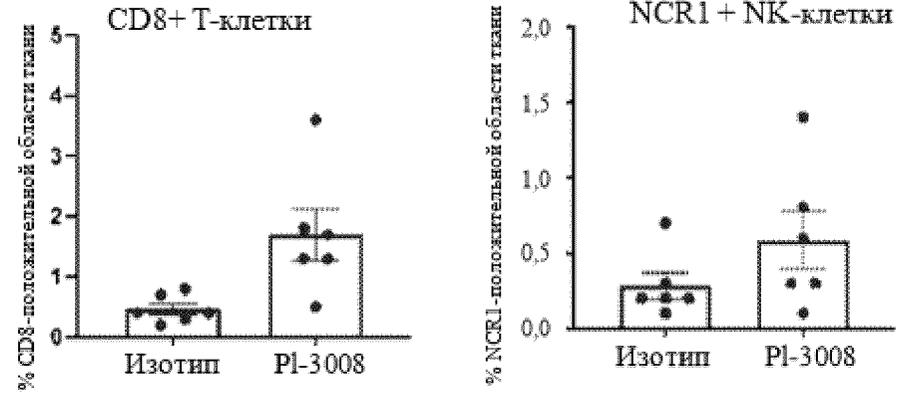
ФК анти-PD-1



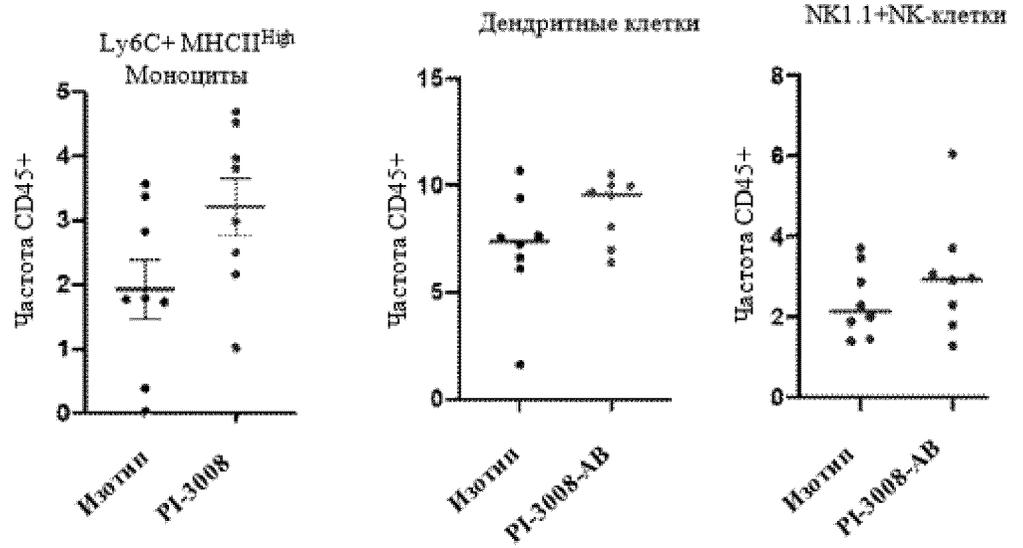
Фиг. 41А



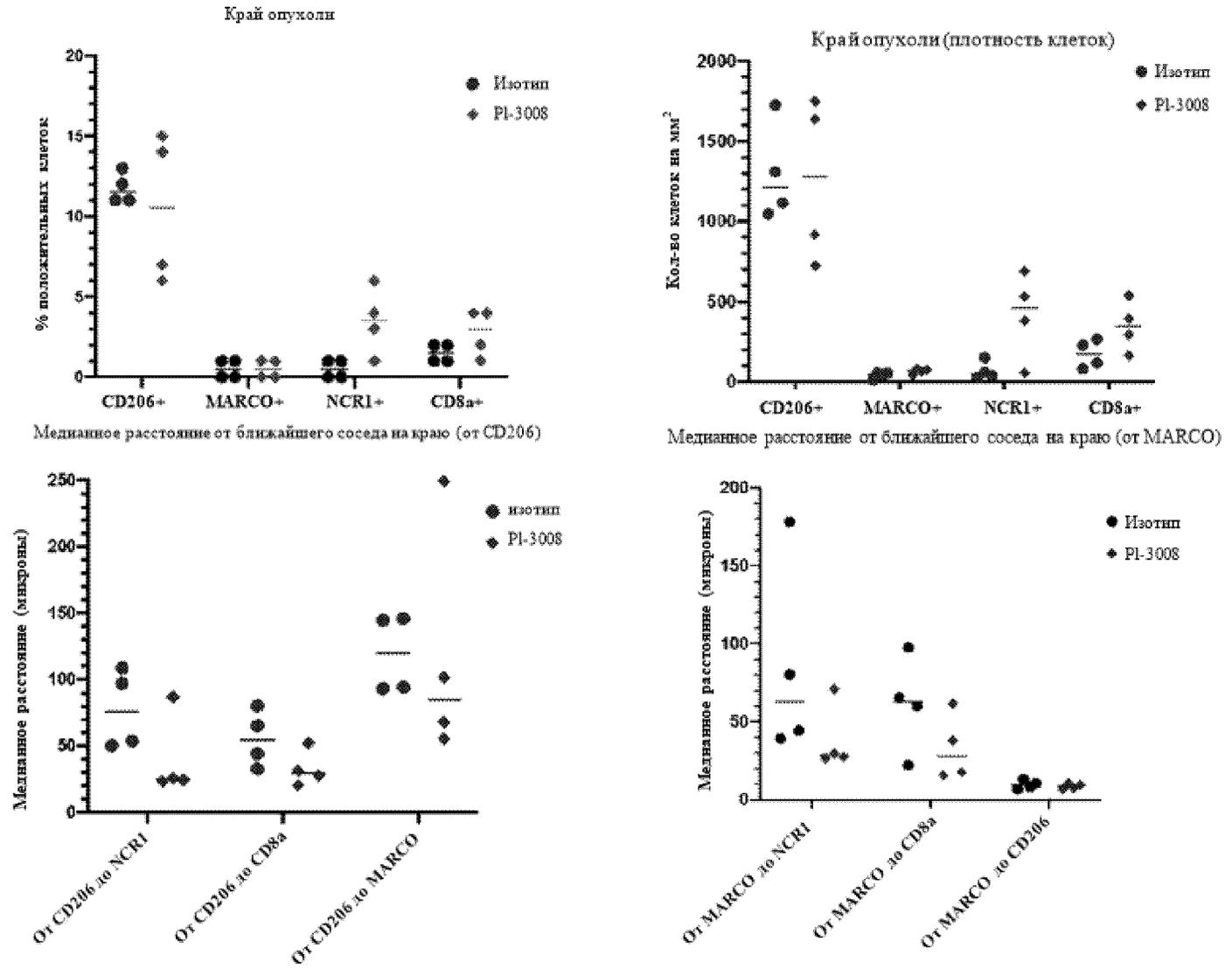
Фиг. 41В

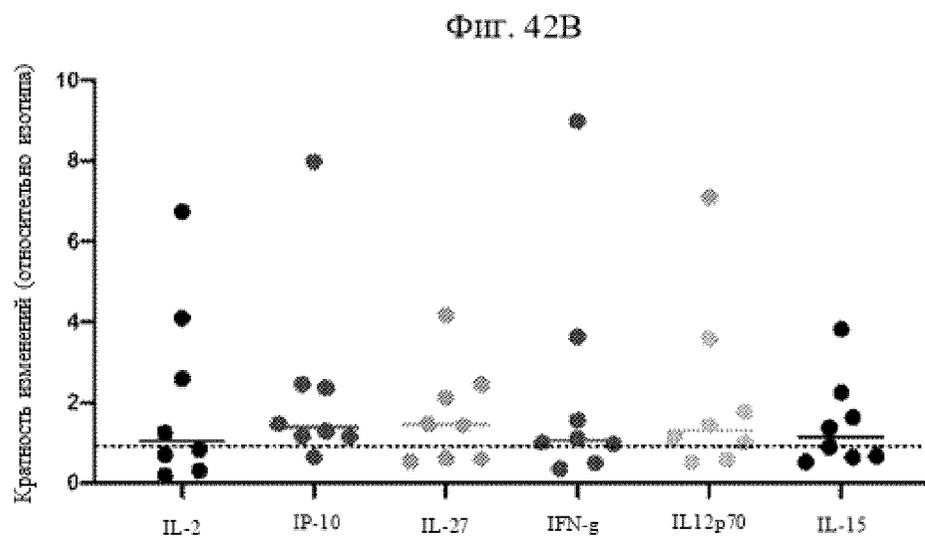
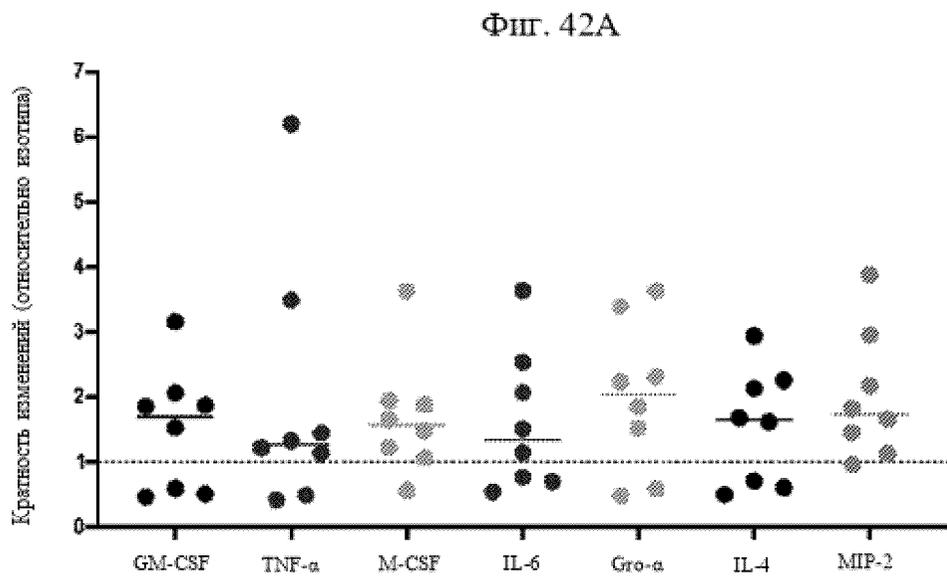


Фиг. 41С

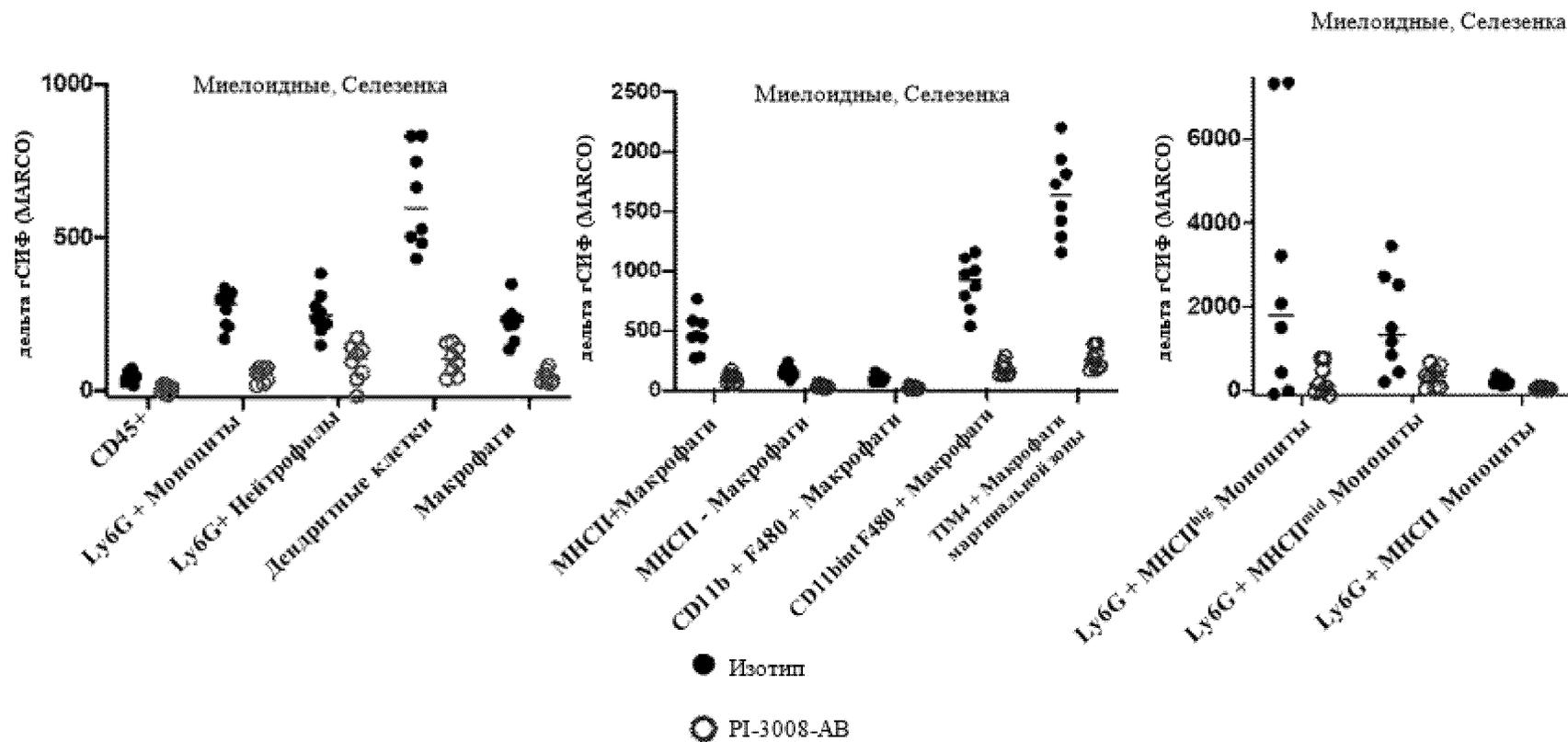


Фиг. 41D

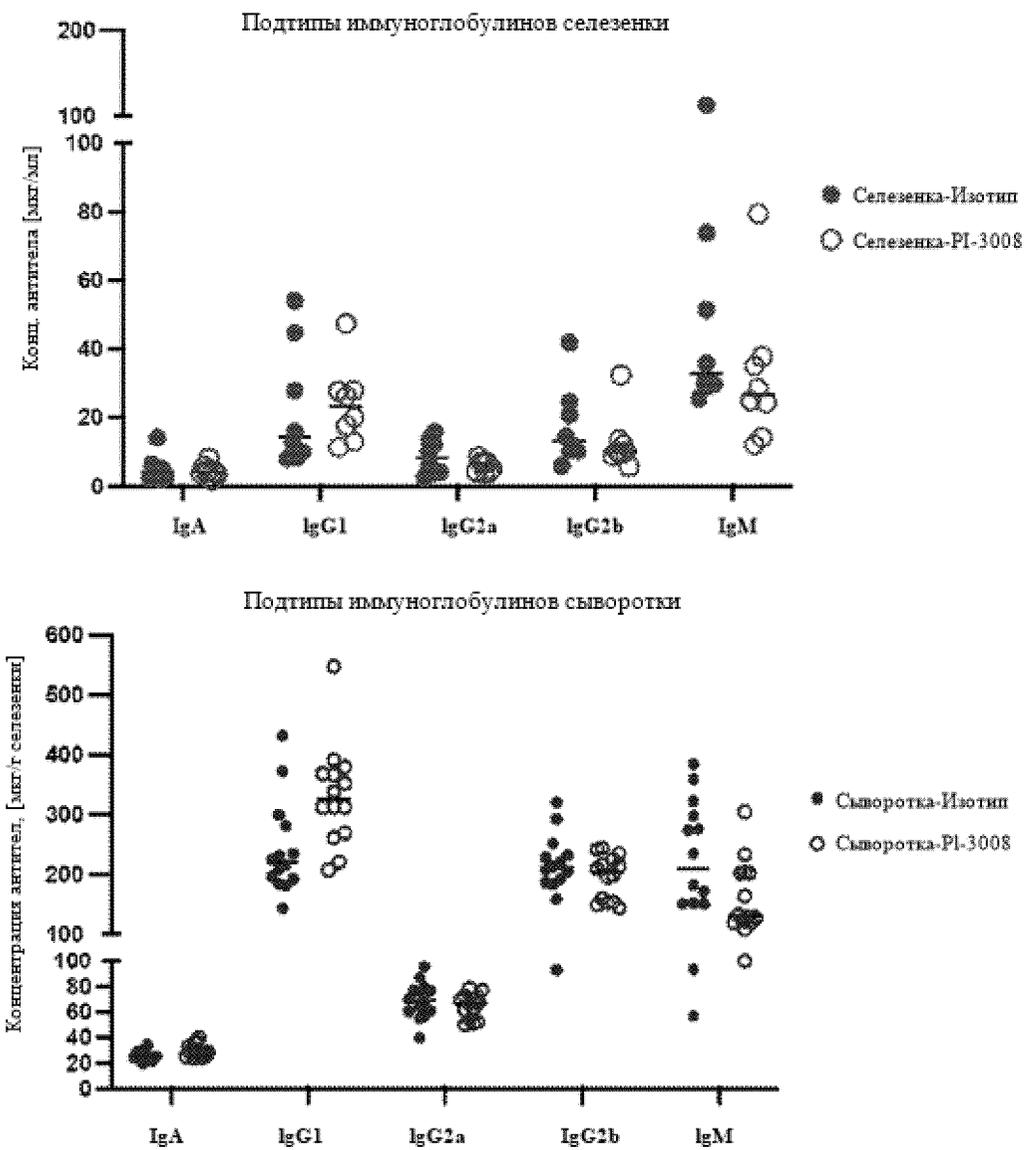




Фиг. 43

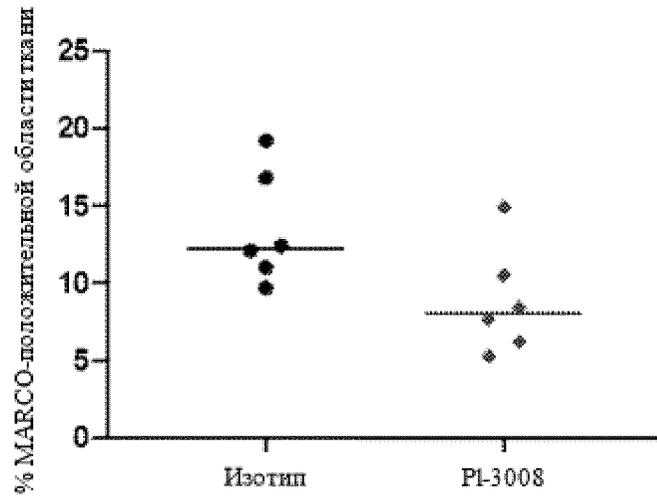


Фиг. 45

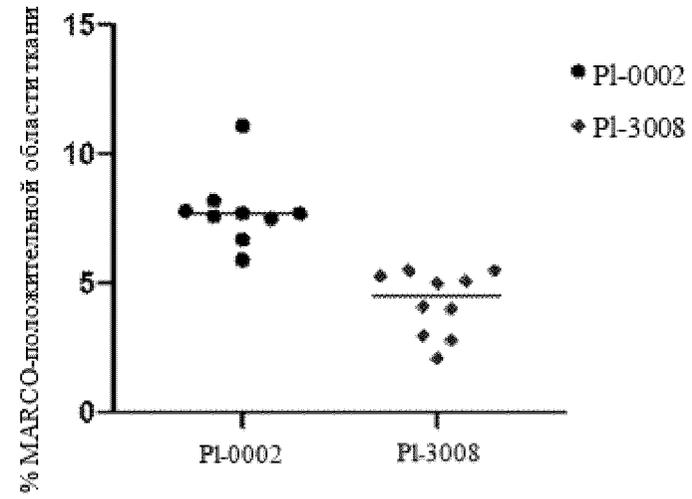


Фиг. 46

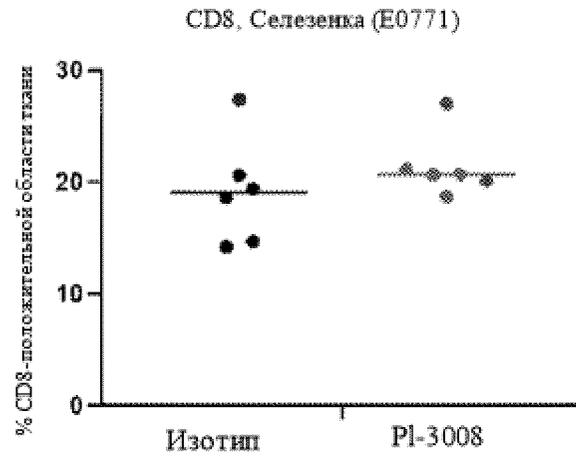
Селезенки после второй дозы (ФД)



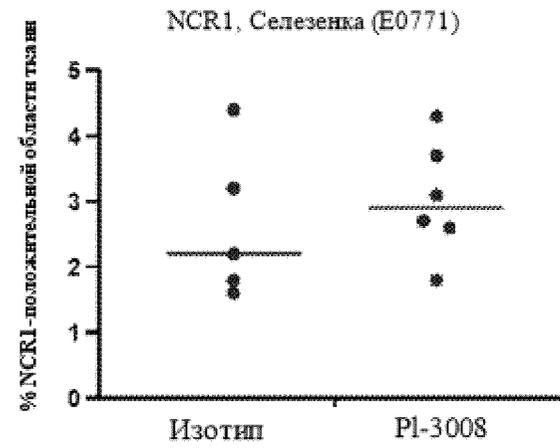
Селезенки в конце исследования (эффективность)



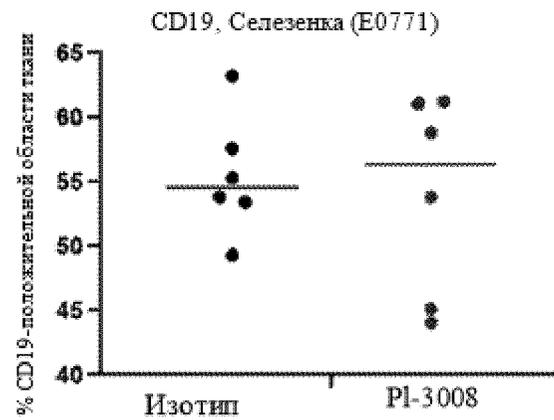
Фиг. 47А



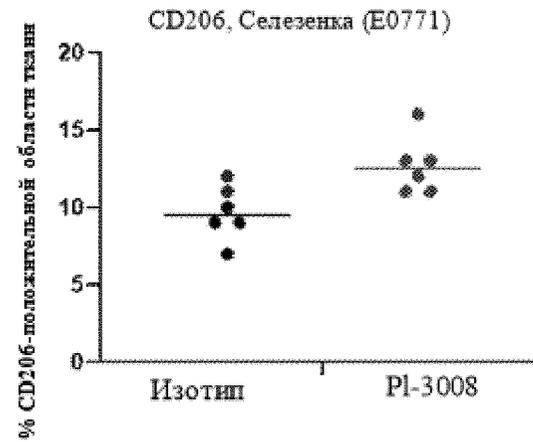
Фиг. 47В

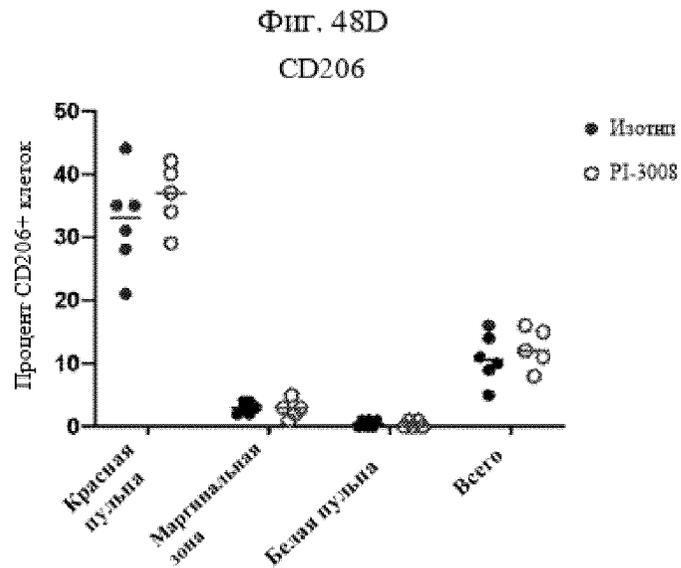
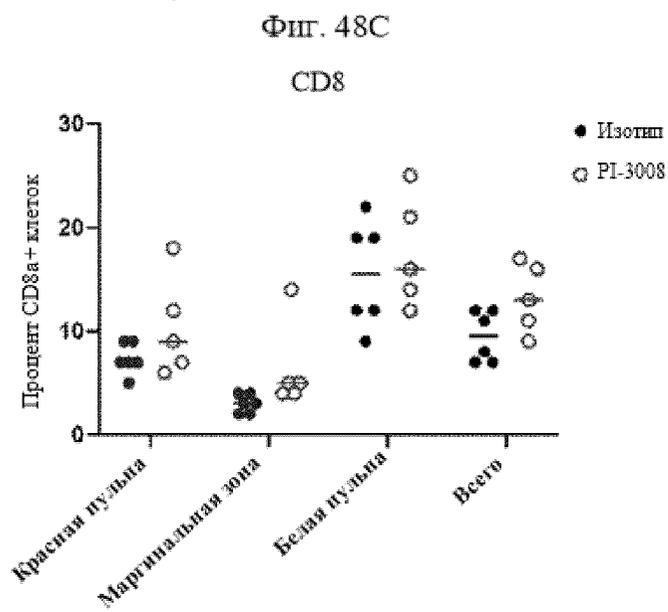
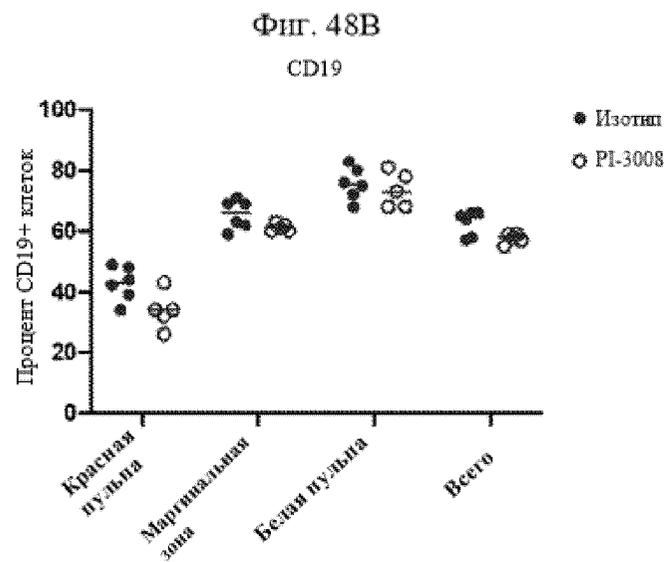
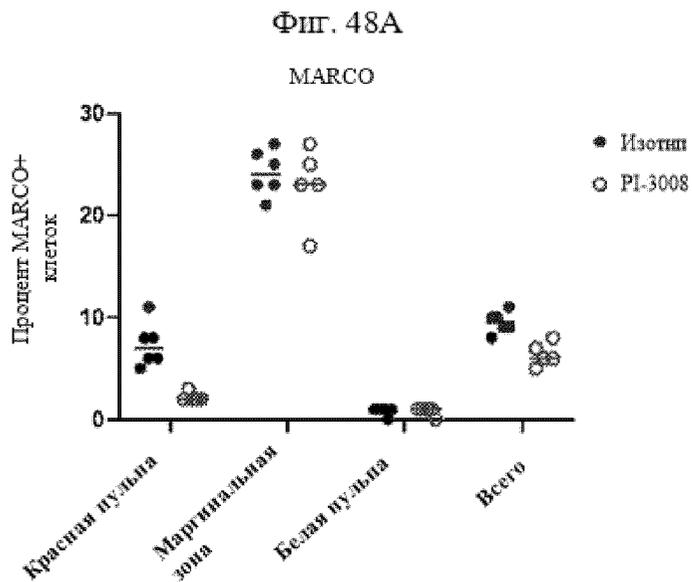


Фиг. 47С

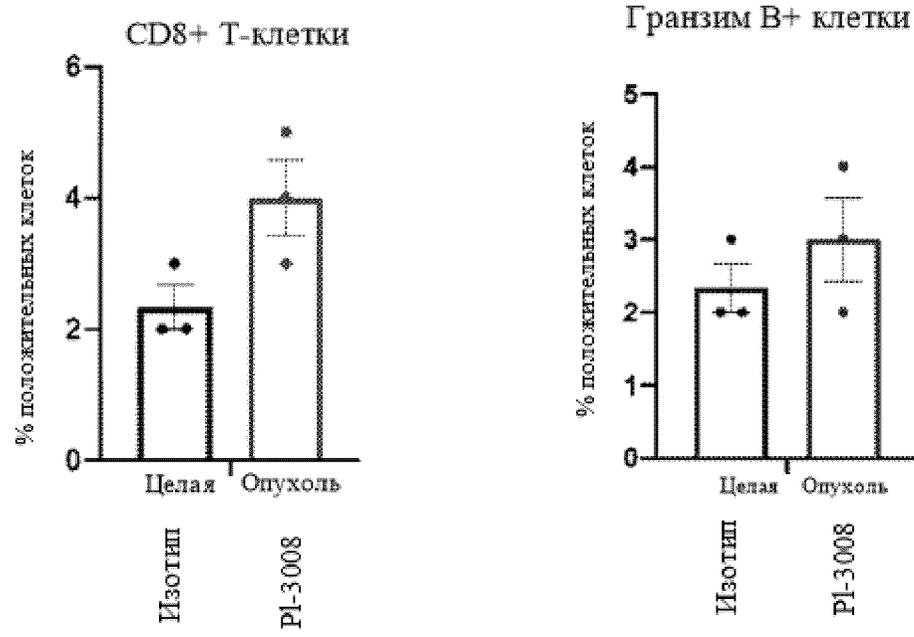


Фиг. 47D

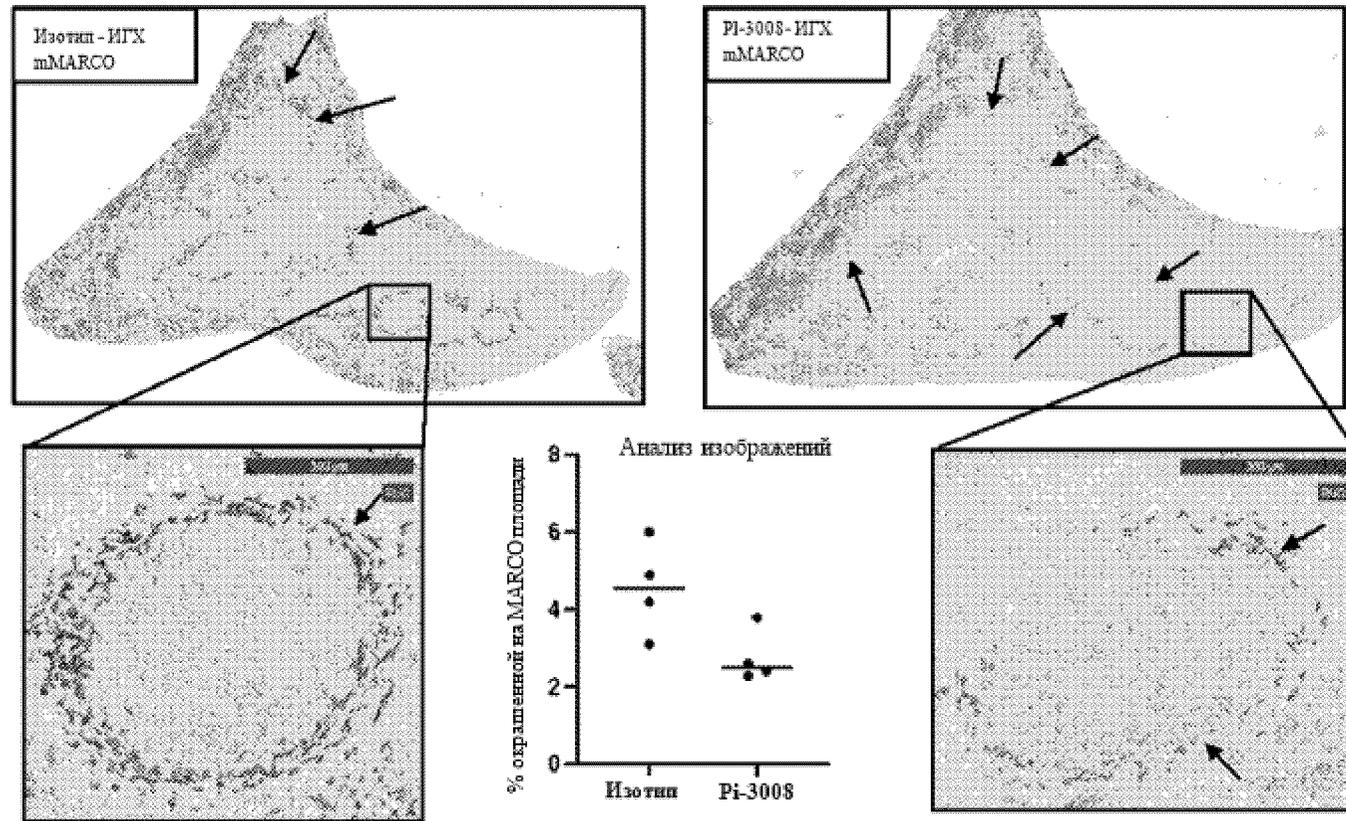




Фиг. 49

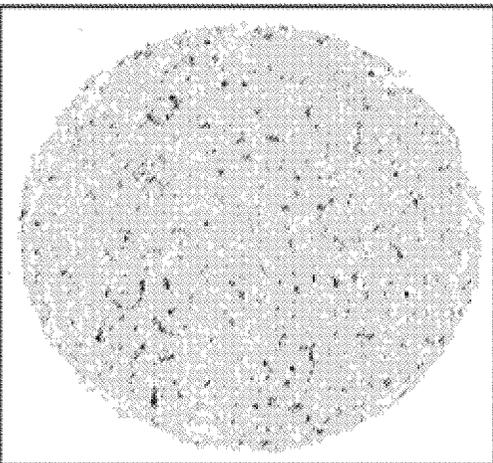
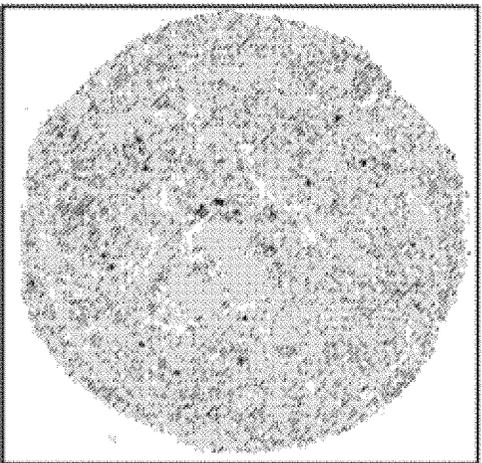
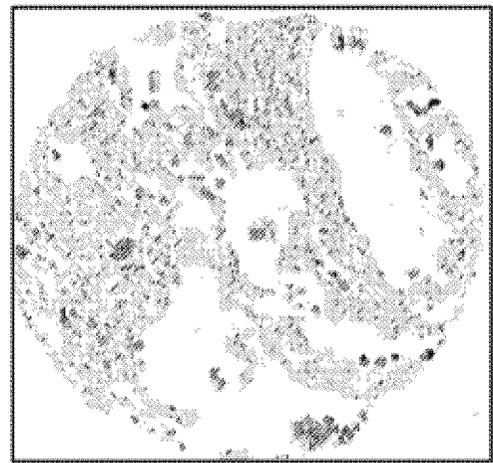
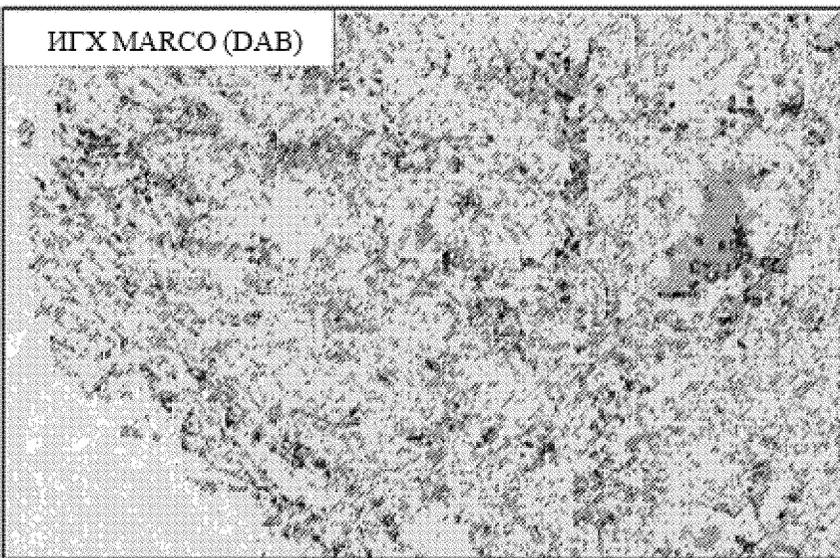
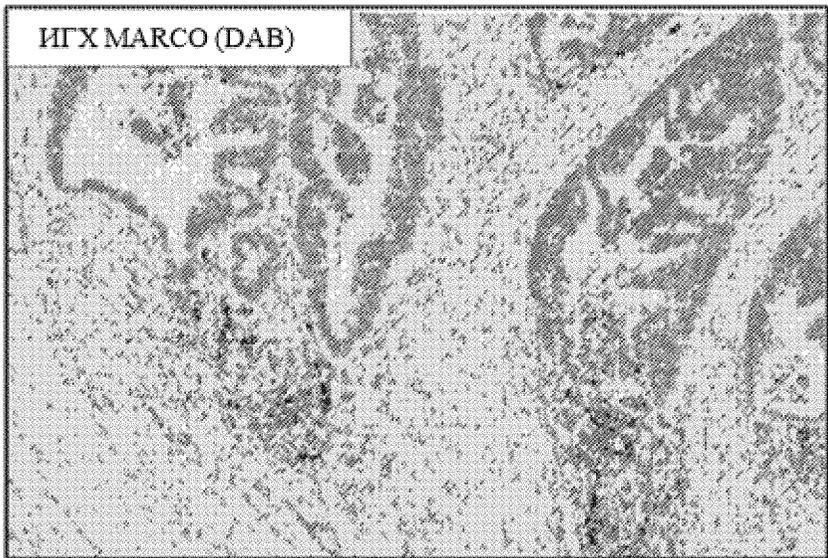


Фиг. 50



Колоректальный рак

Рак легкого



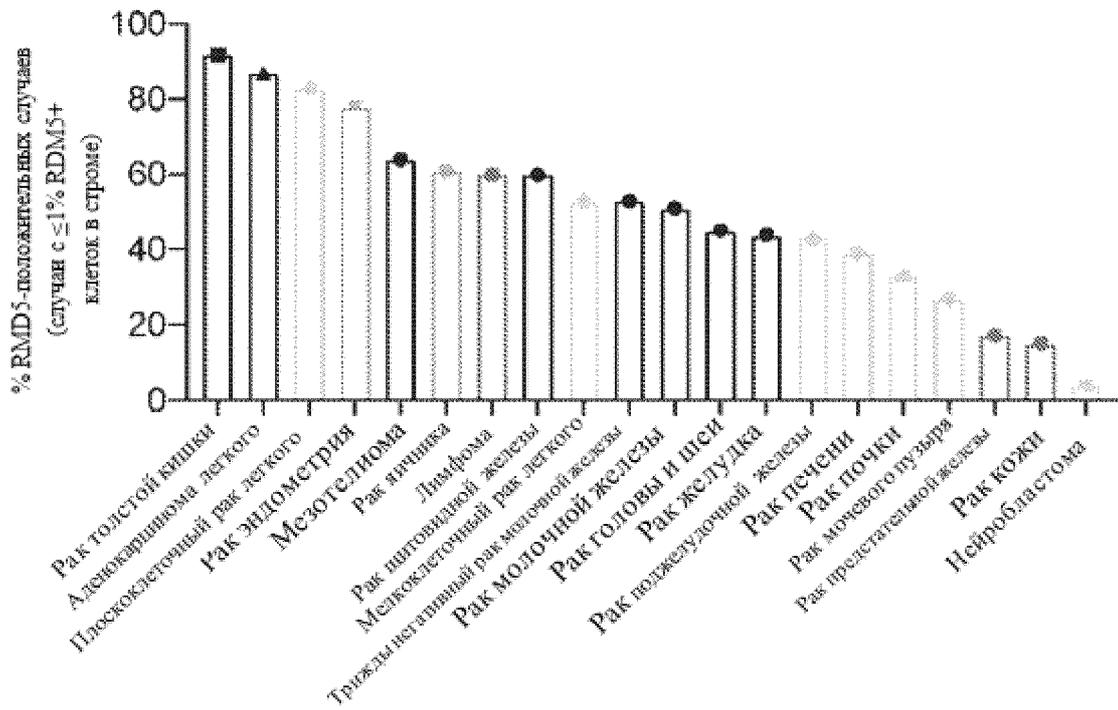
Нормальное легкое

Нормальная селезенка

Нормальная печень

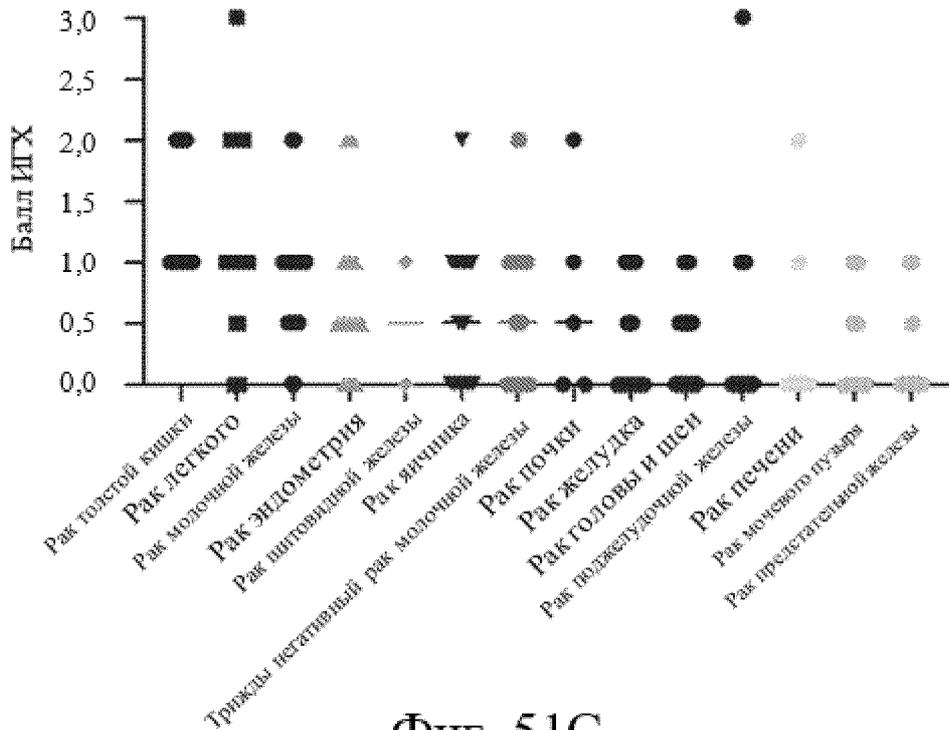
Фиг. 51А

63/85



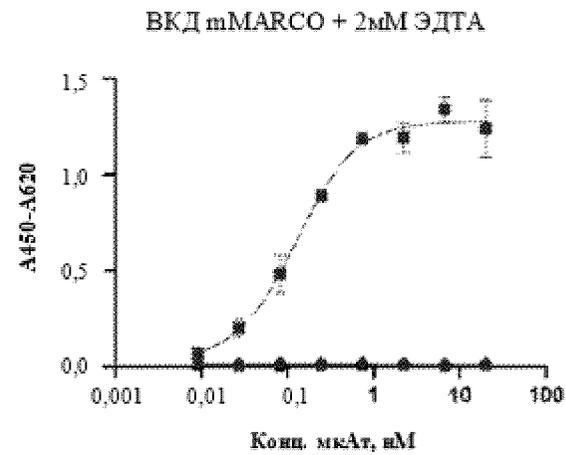
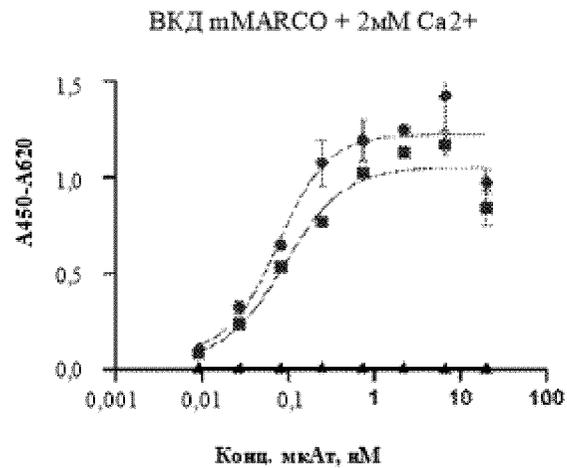
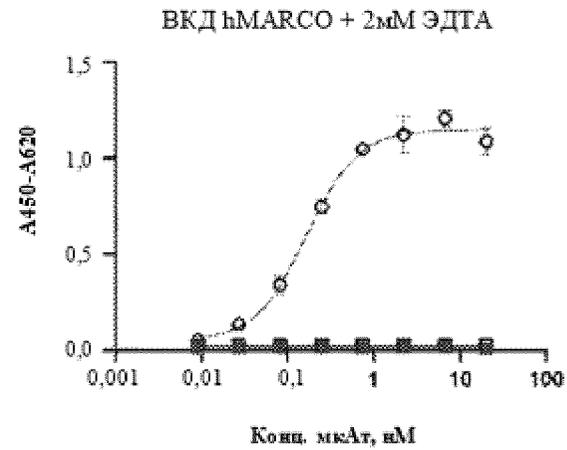
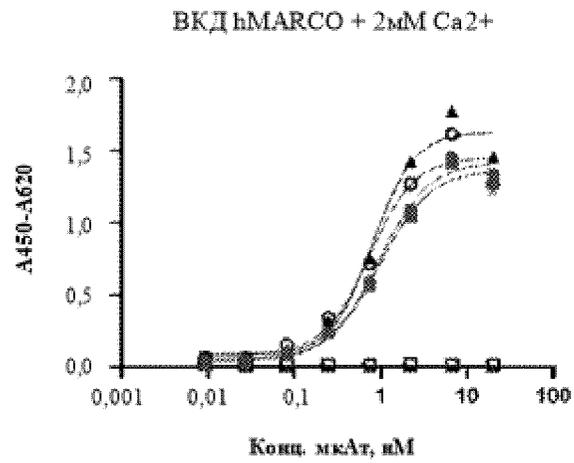
Фиг. 51В

Опухоли III степени злокачественности

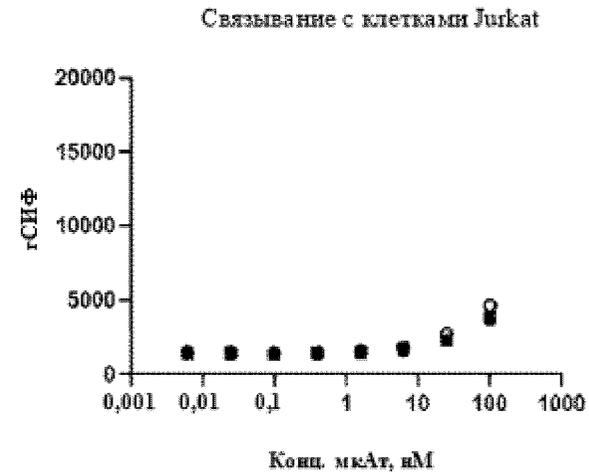
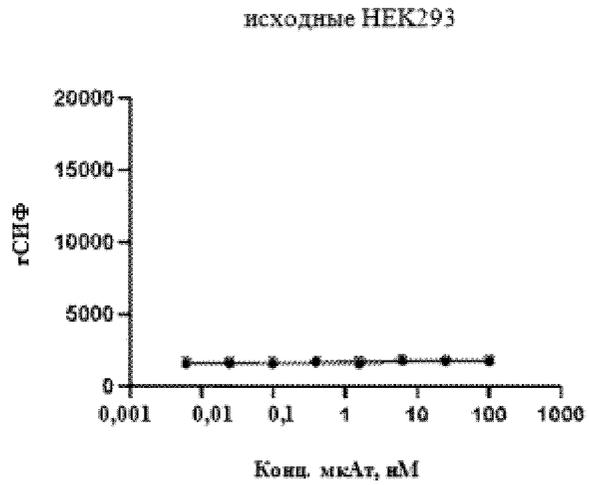
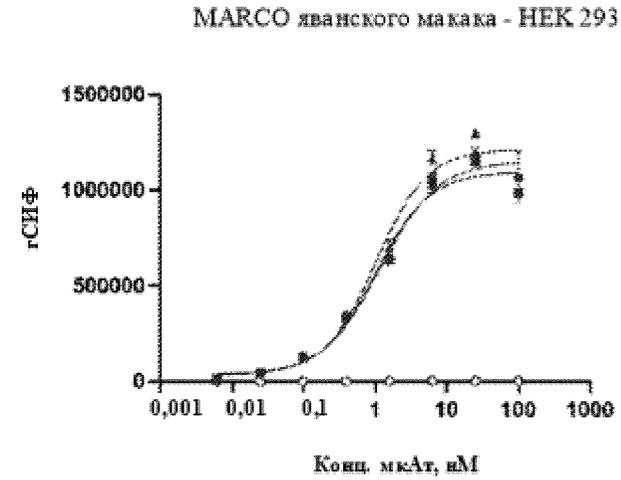
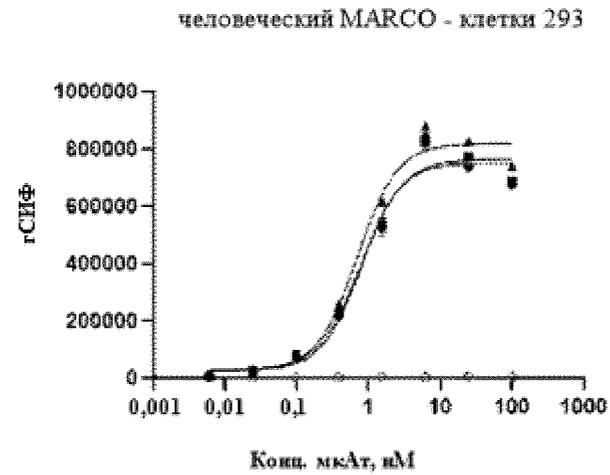


Фиг. 51С

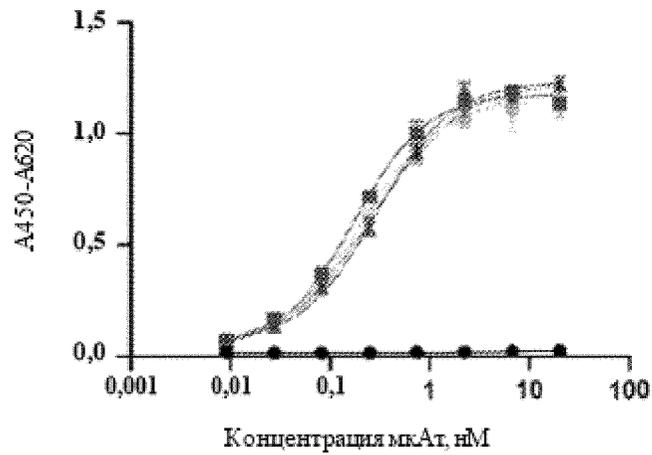
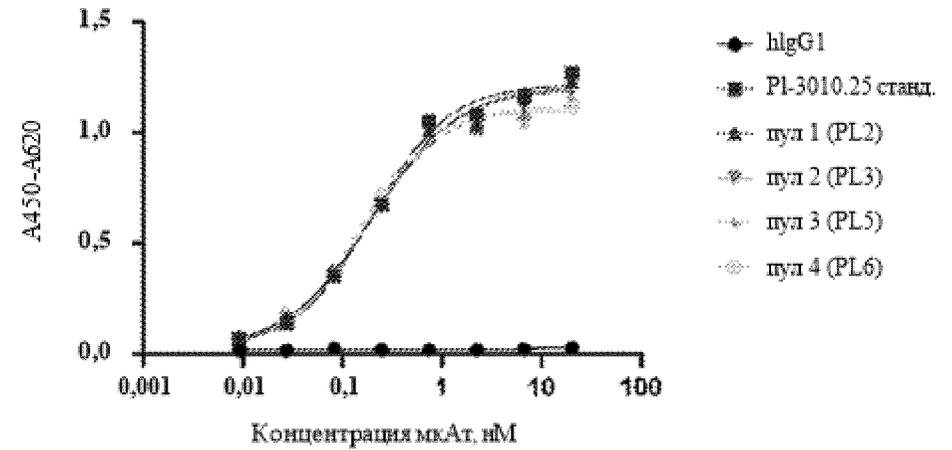
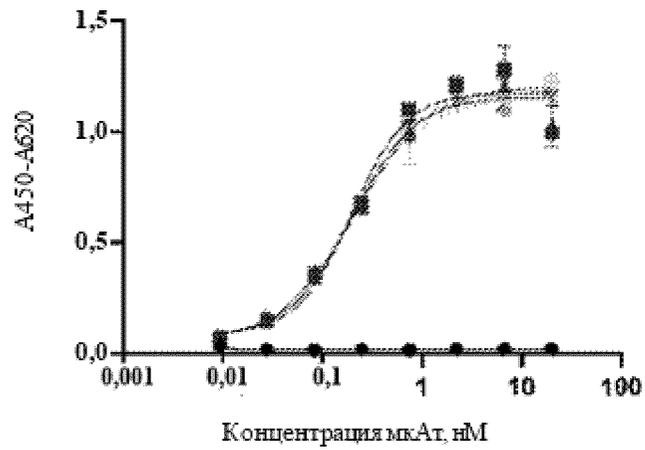
Фиг. 52

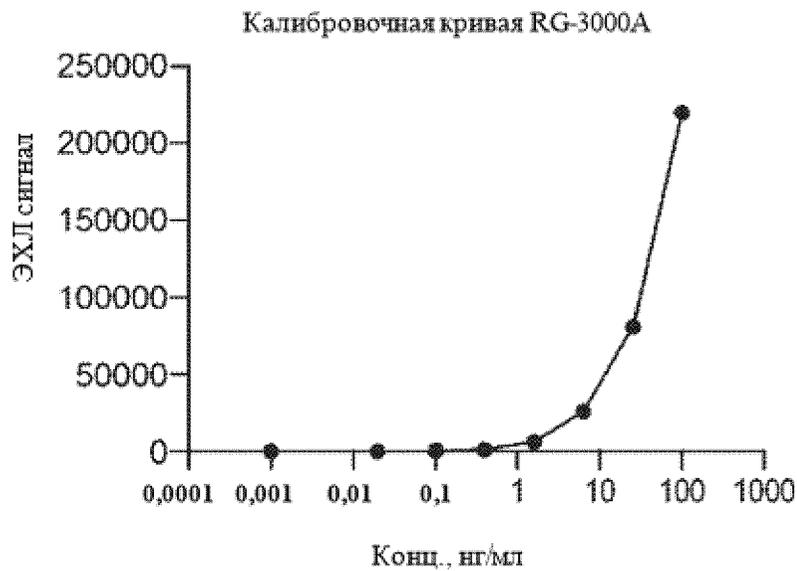


Фиг. 53



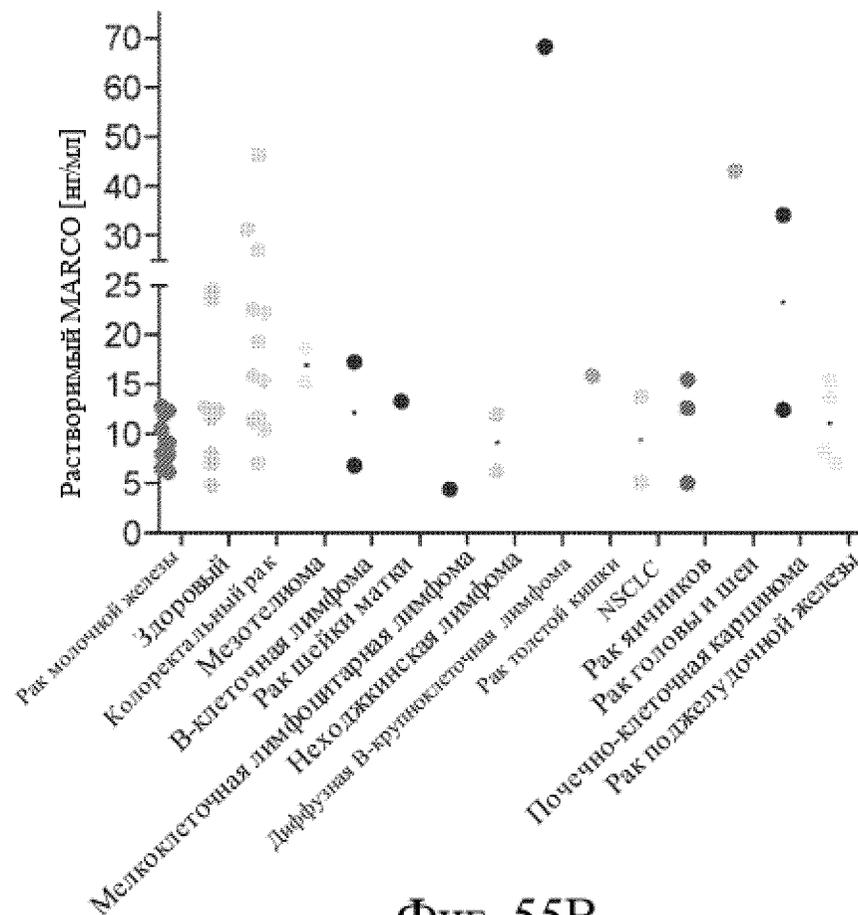
Фиг. 54



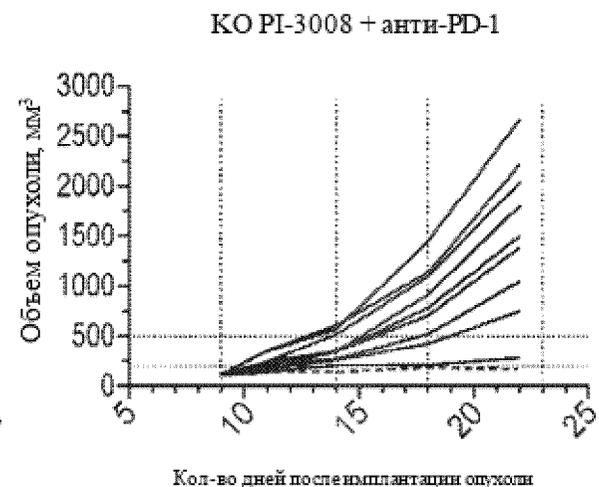
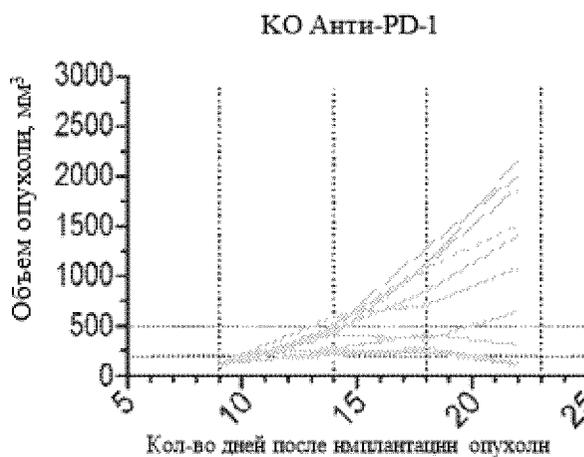
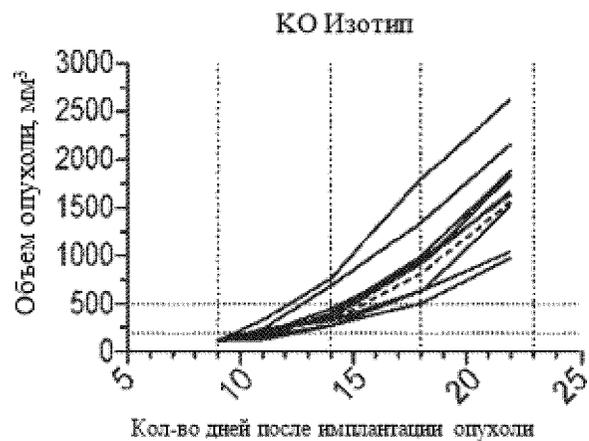
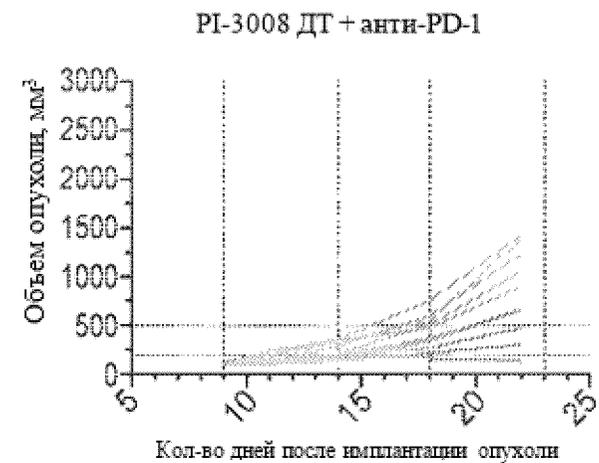
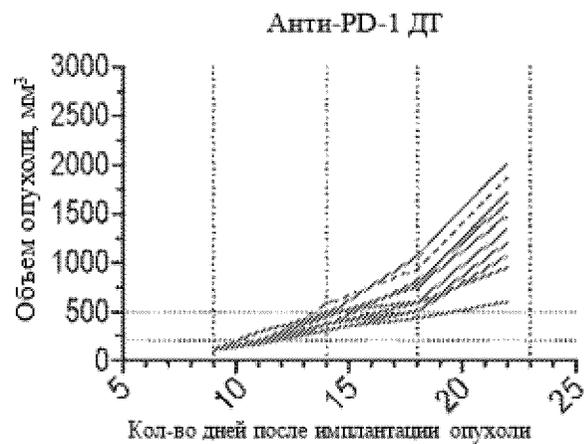
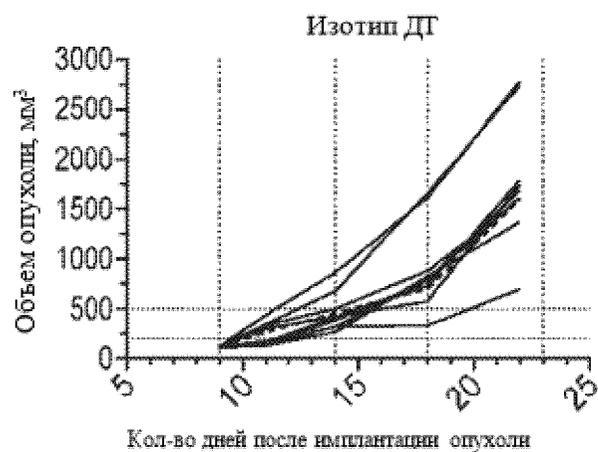


Фиг. 55А

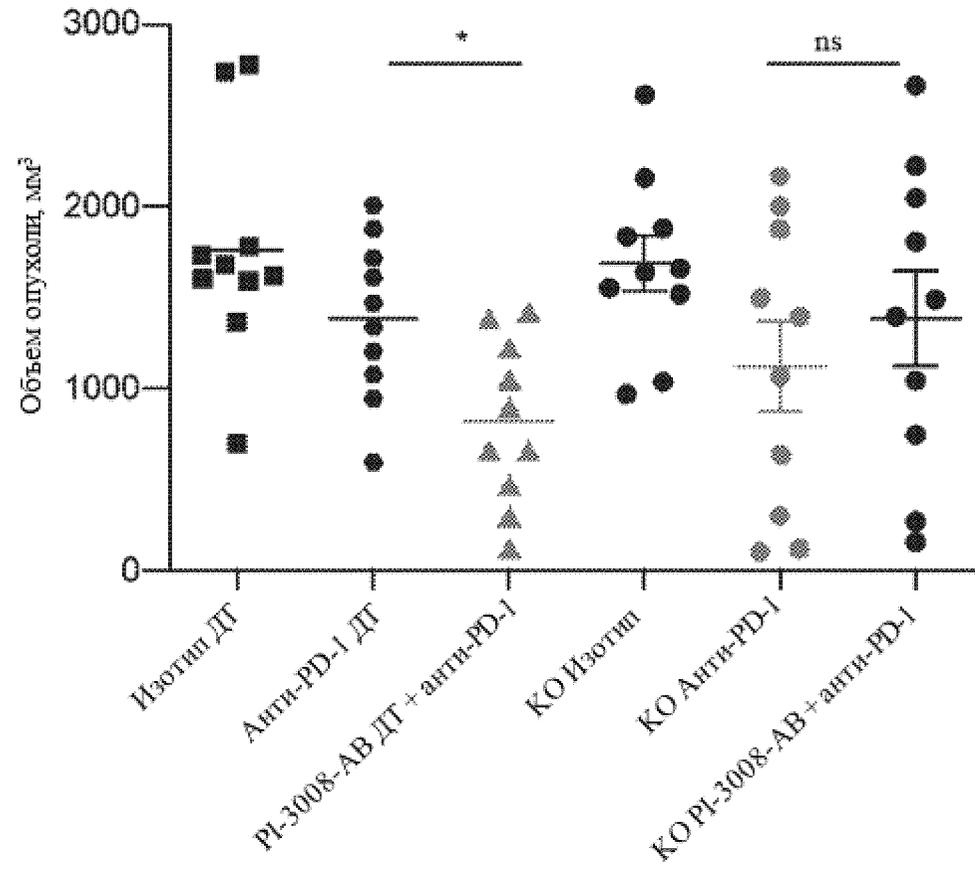
Уровни sMARCO у здоровых пациентов и пациентов со злокачественным новообразованием



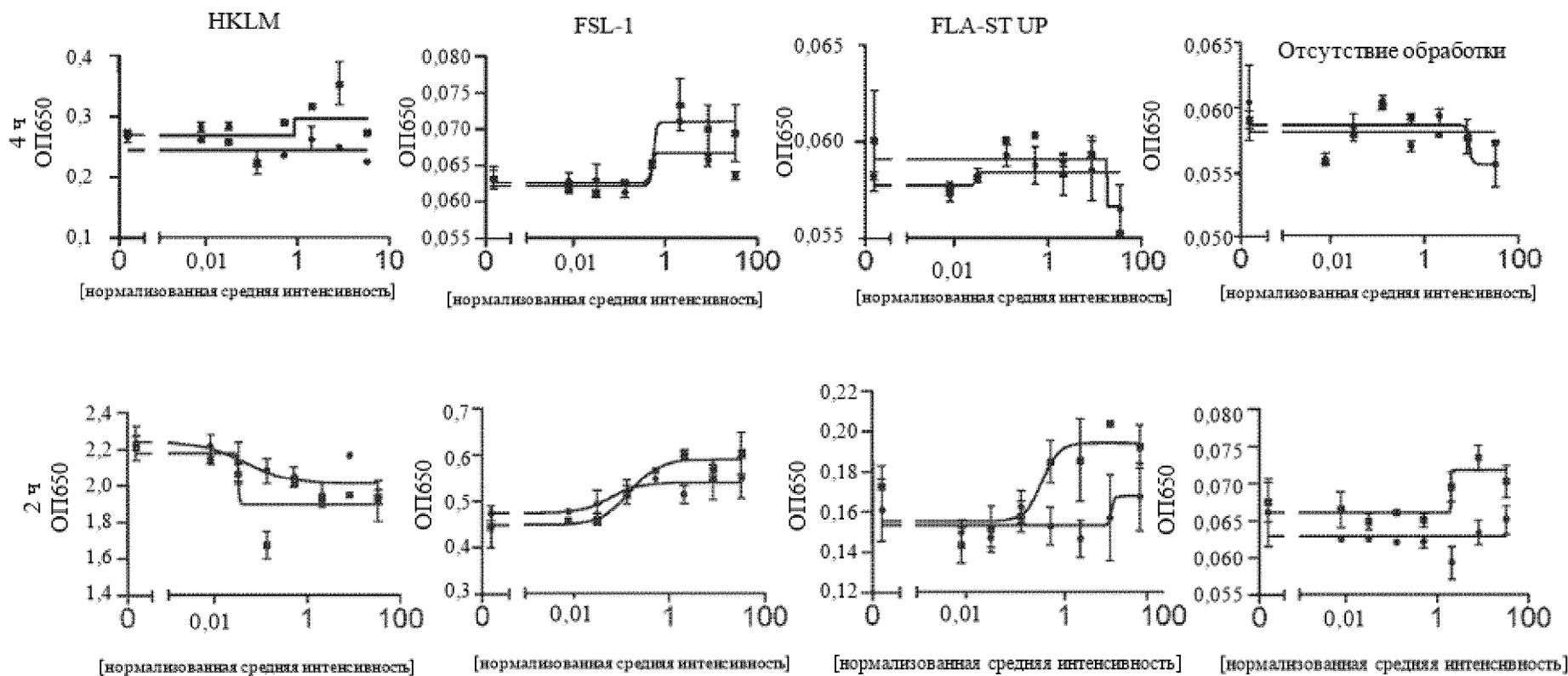
Фиг. 55В



Фиг. 56



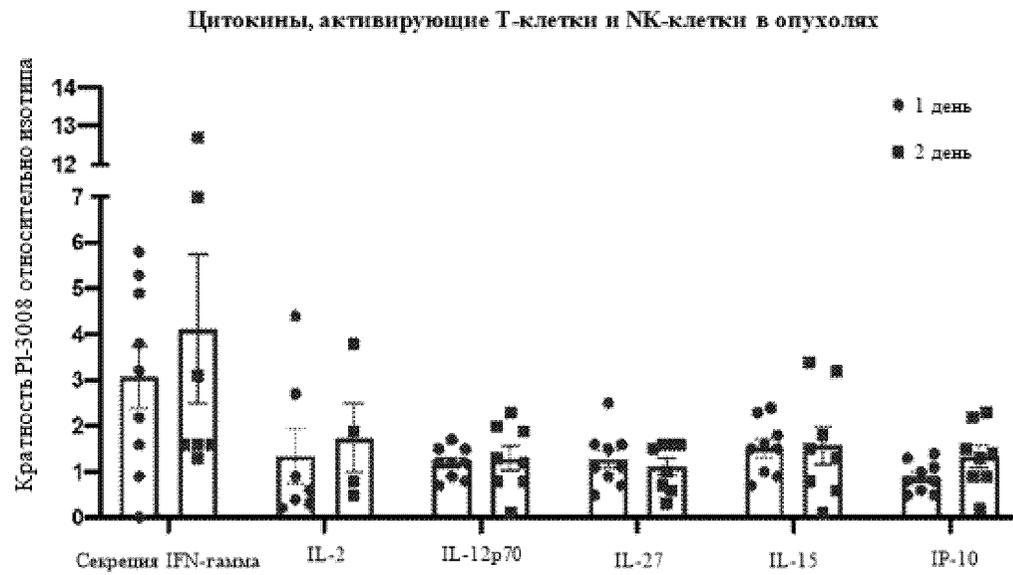
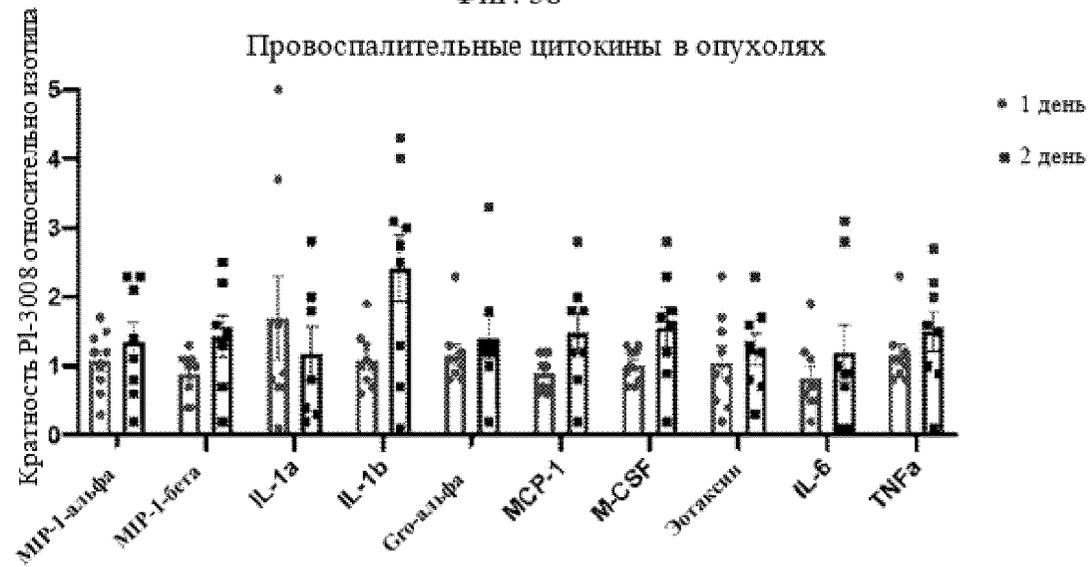
Фиг. 56 (продолжение)



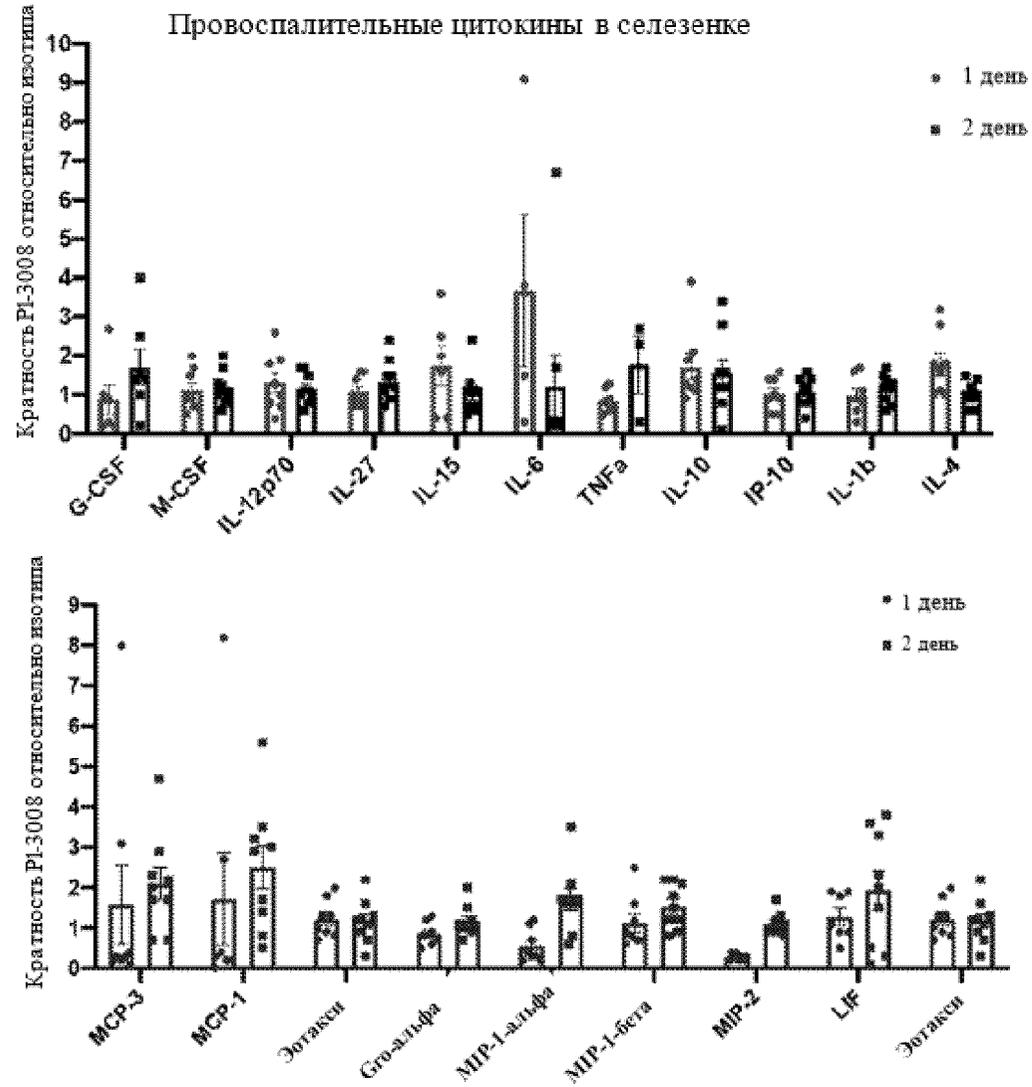
•Изотип
 •PI-3015

Фиг. 57

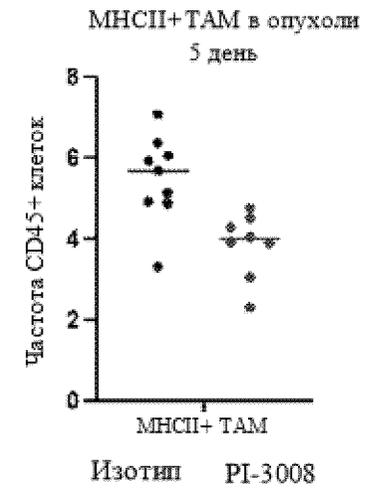
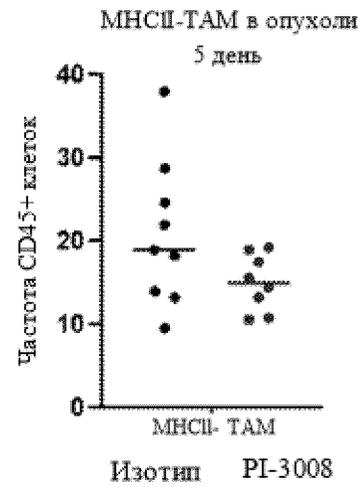
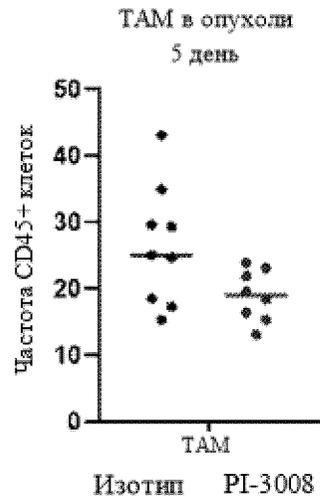
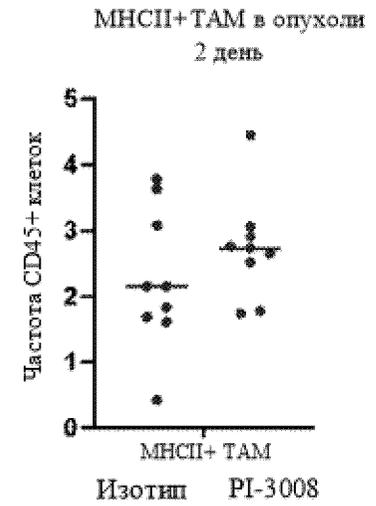
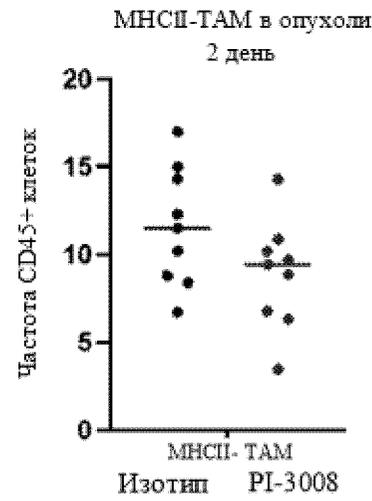
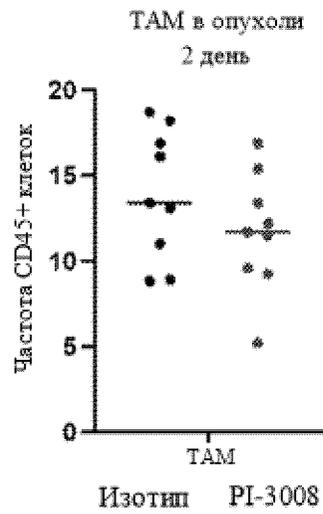
Фиг. 58



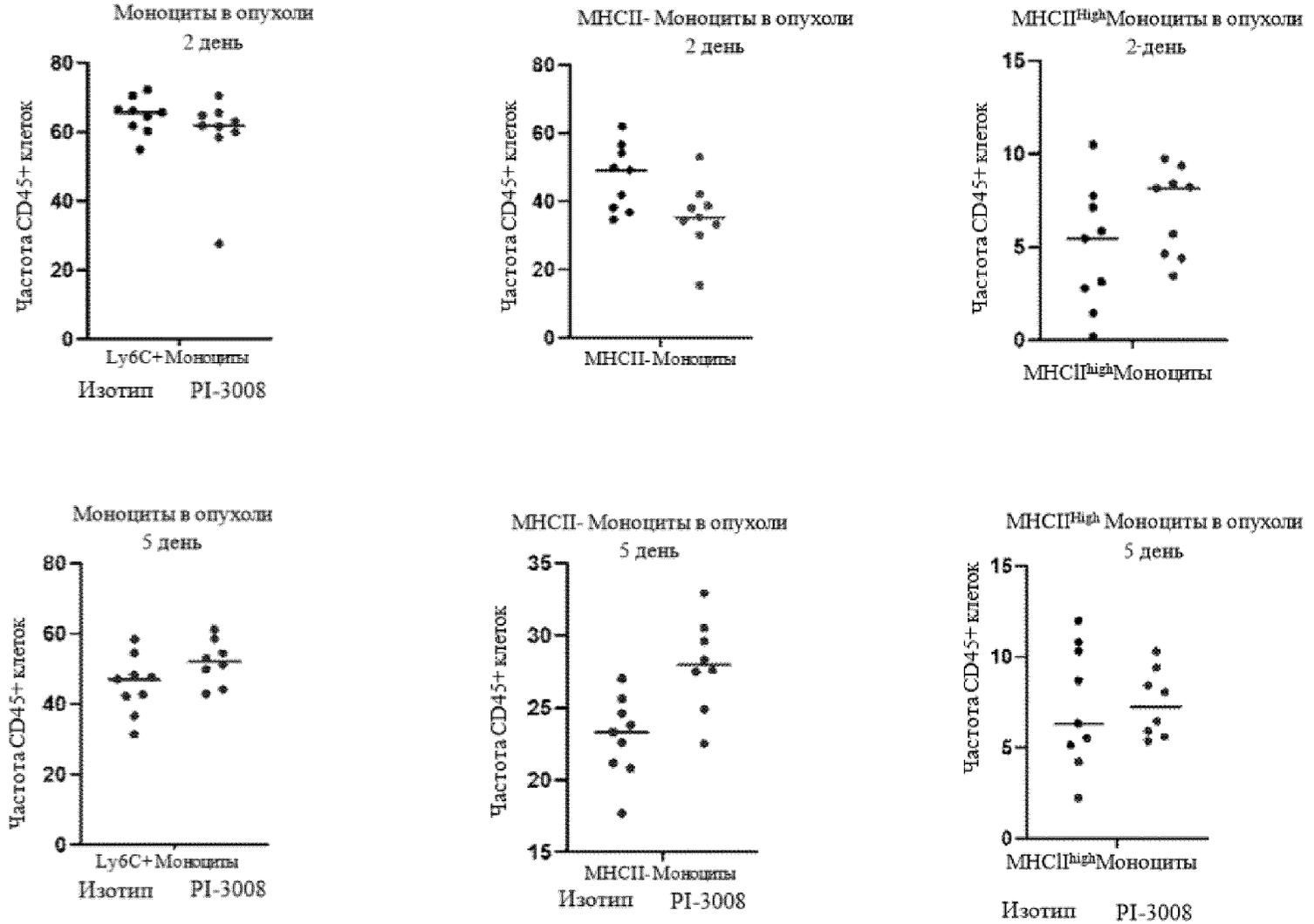
Фиг. 59



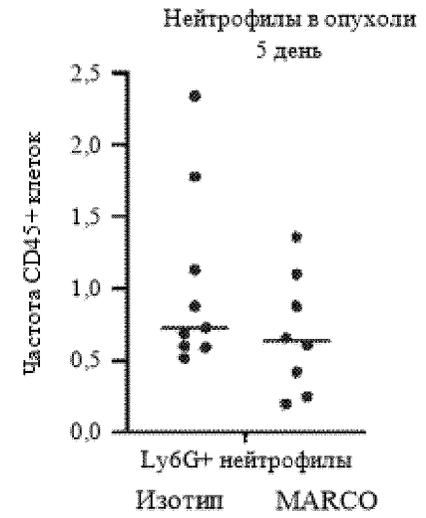
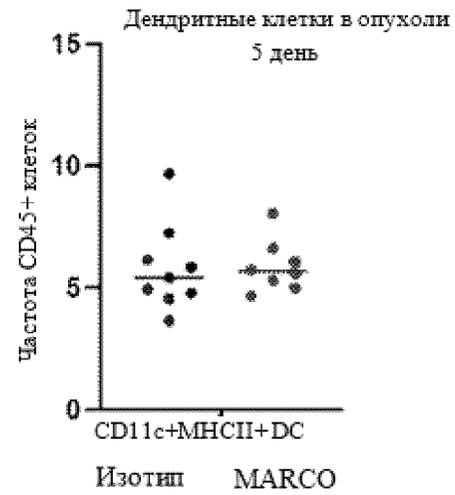
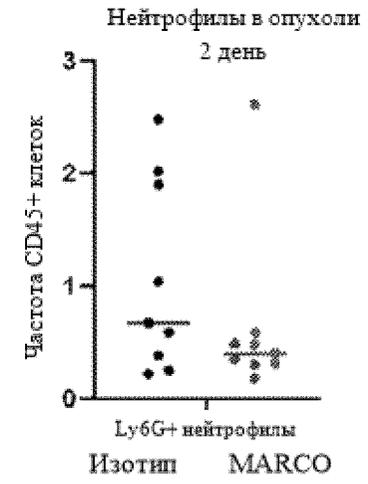
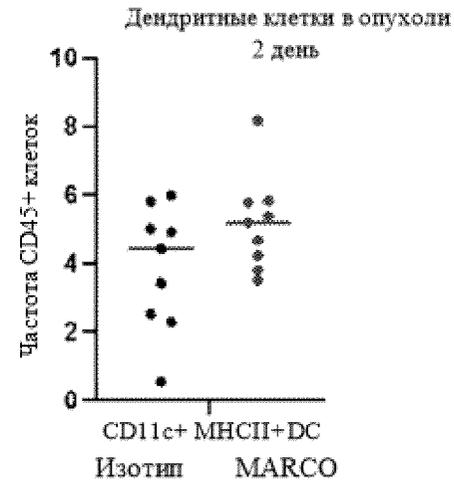
Фиг. 60



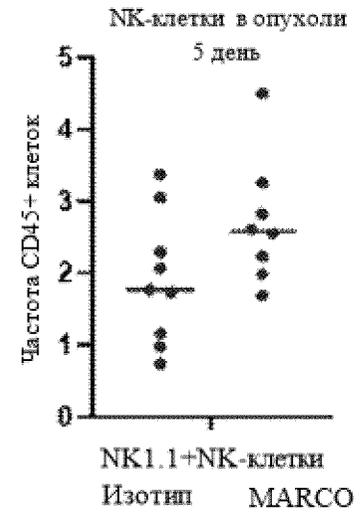
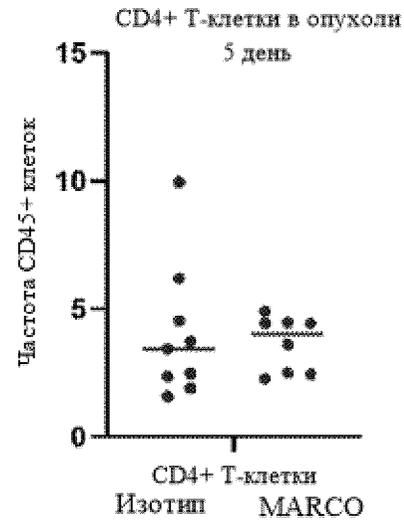
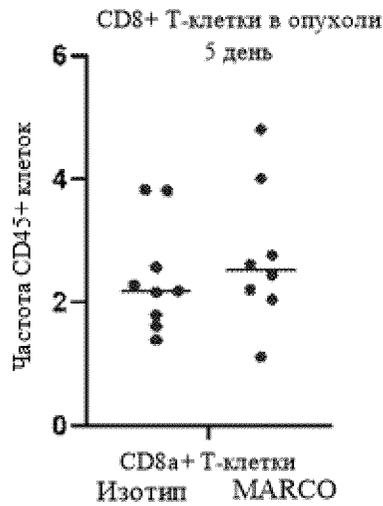
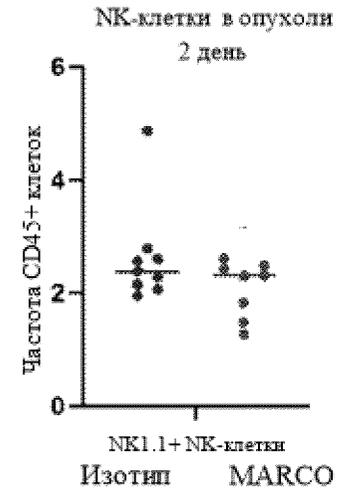
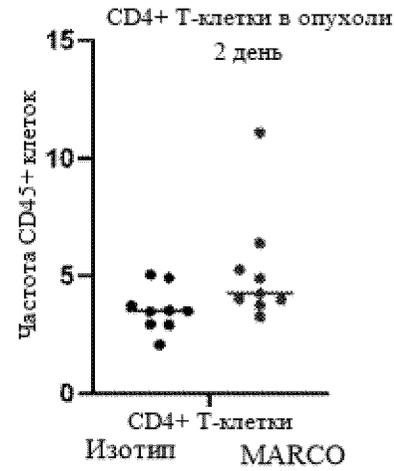
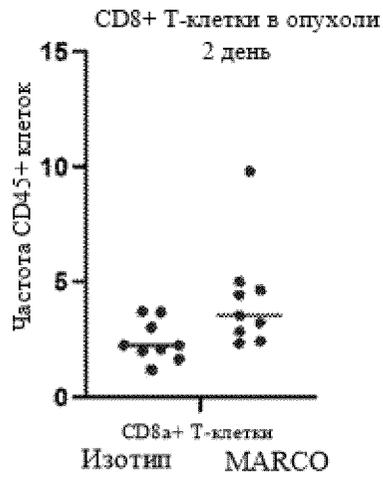
Фиг. 61



Фиг. 62

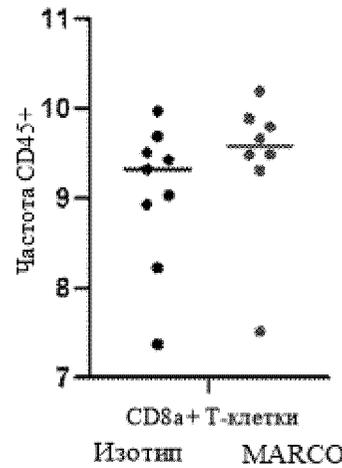


Фиг. 63

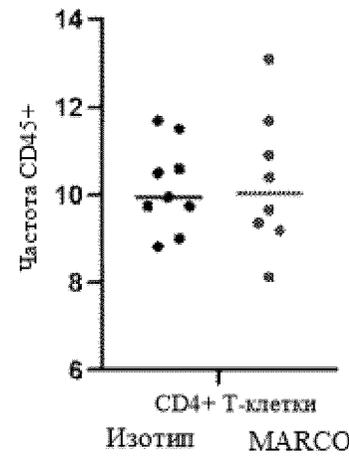


ФИГ. 65

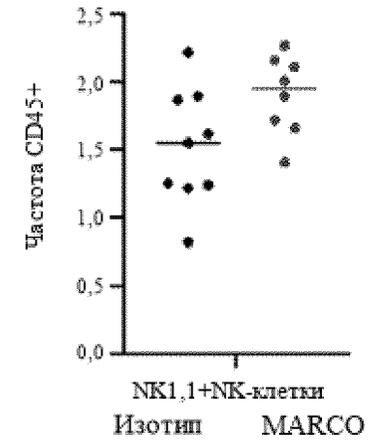
CD8+ Т-клетки в селезенке
5 день



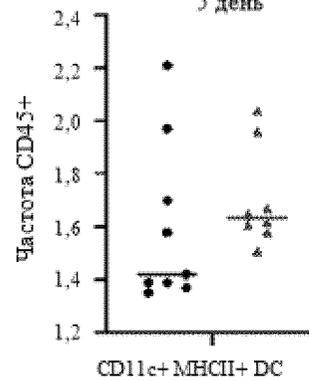
CD4+ Т-клетки в селезенке
5 день



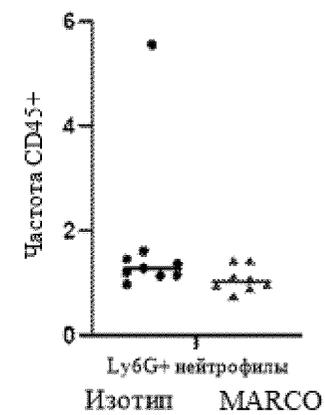
NK-клетки в селезенке
5 день



Дендритные клетки в селезенке
5 день

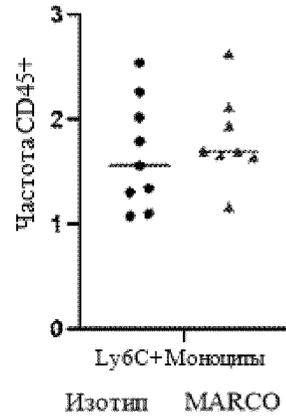


Нейтрофилы в селезенке
5 день

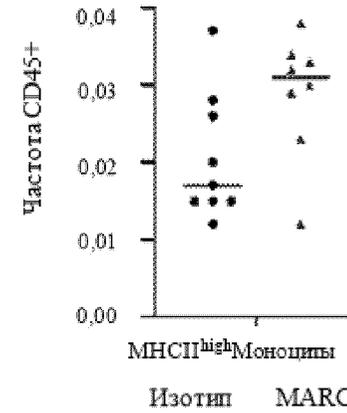


Фиг. 66

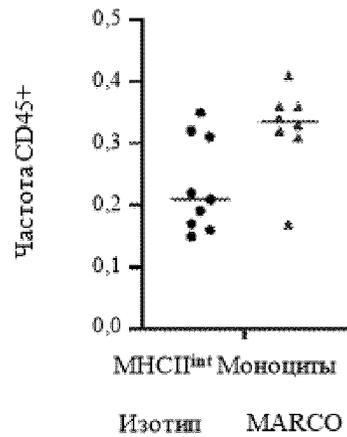
Моноциты в селезенке
5 день



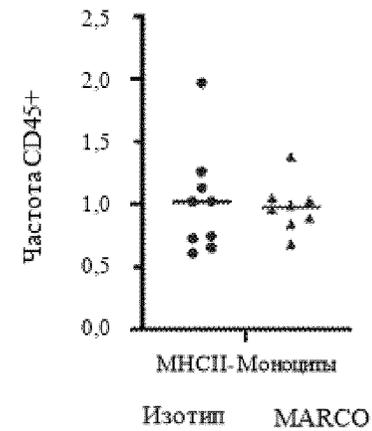
MHCII^{High} Моноциты в селезенке
5 день



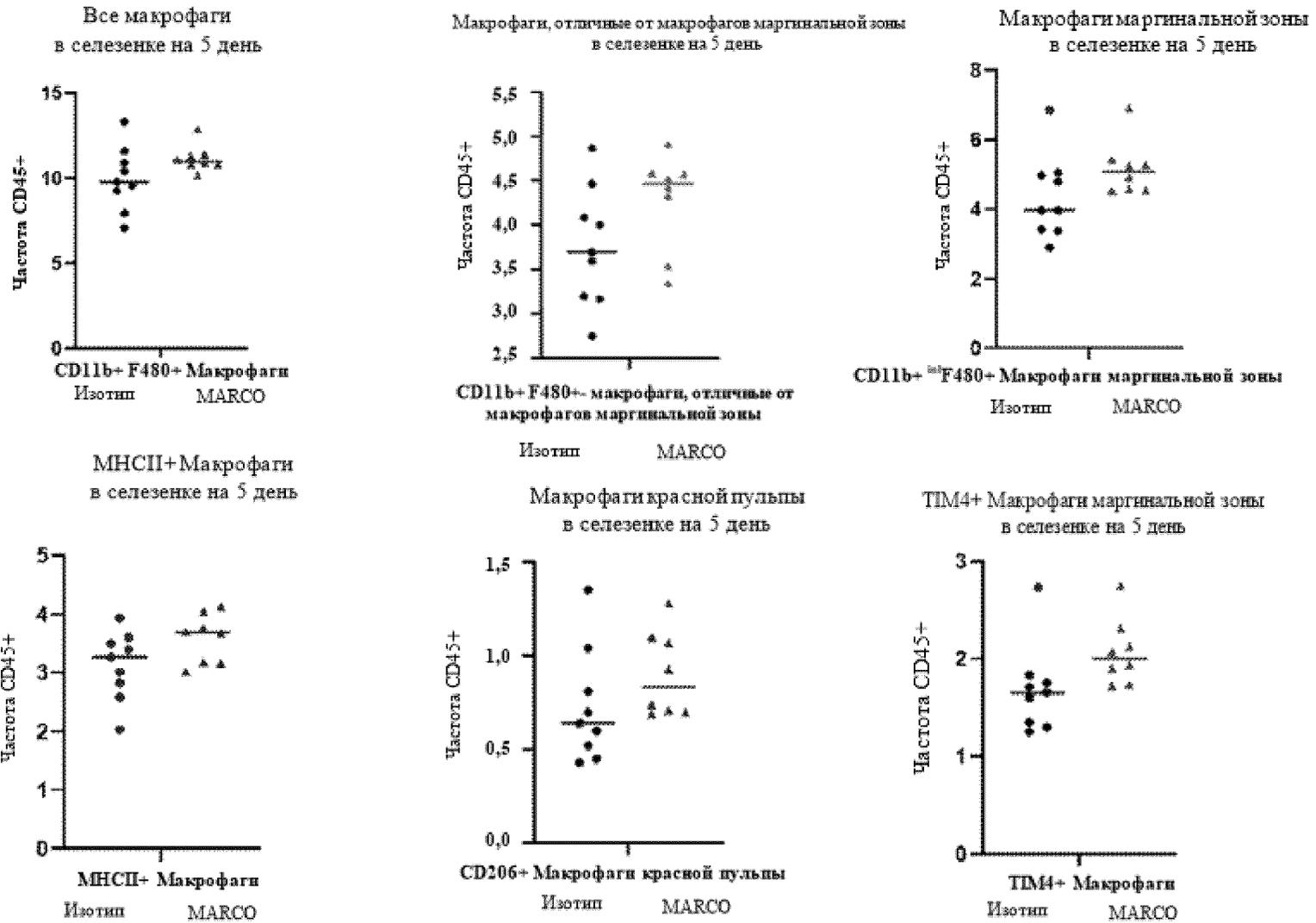
MHCII^{Int} Моноциты в селезенке
5 день



MHCII- Моноциты в селезенке
5 день

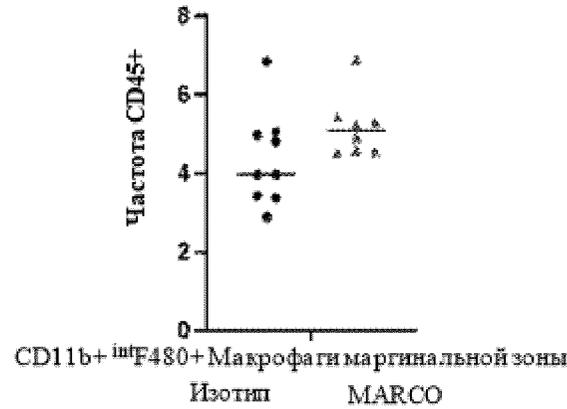


Фиг. 67

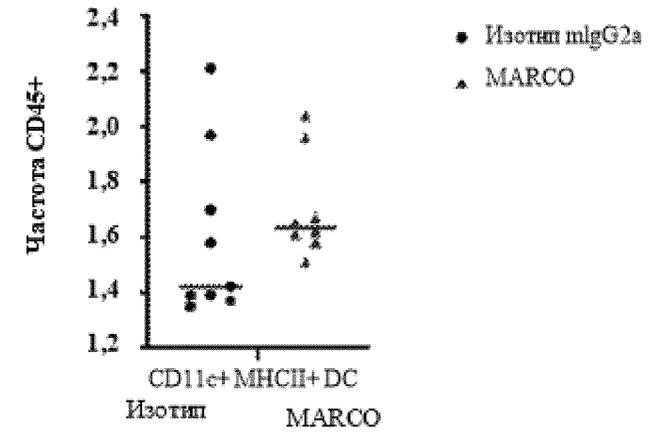


Фиг. 68

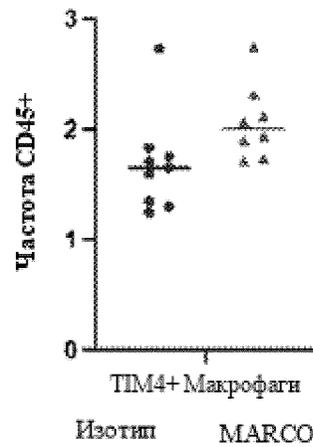
CD45+, CD11b+ intF480+ Макрофаги маргинальной зоны,
Миелоидные, Селезенка, 5 день



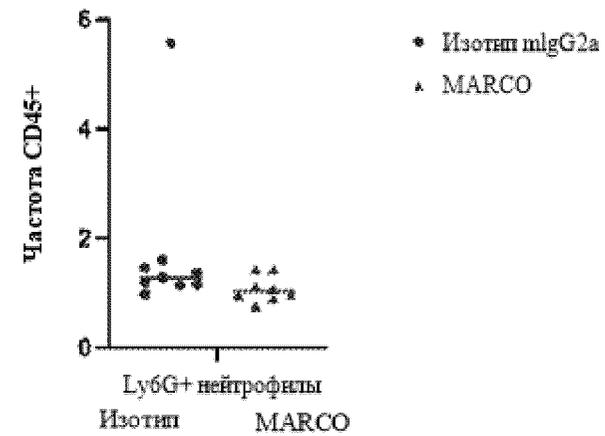
CD45+, CD11c+ MHCII+ DC,
Миелоидные, Селезенка, 5 день



CD45+, TIM4+ Макрофаги,
Миелоидные, Селезенка, 5 день

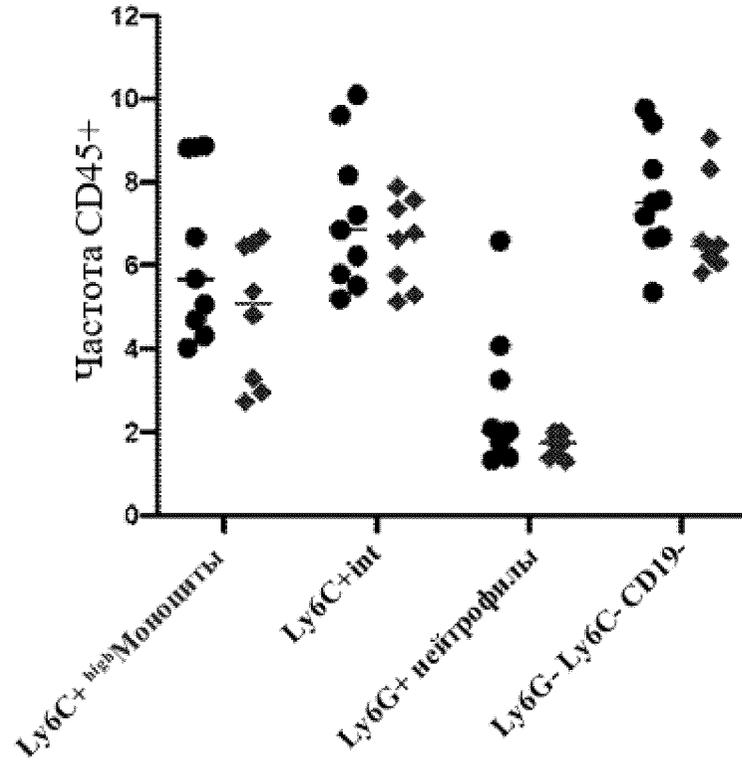


CD45+, Lyb6G+ Нейтрофилы,
Миелоидные, Селезенка, 5 день

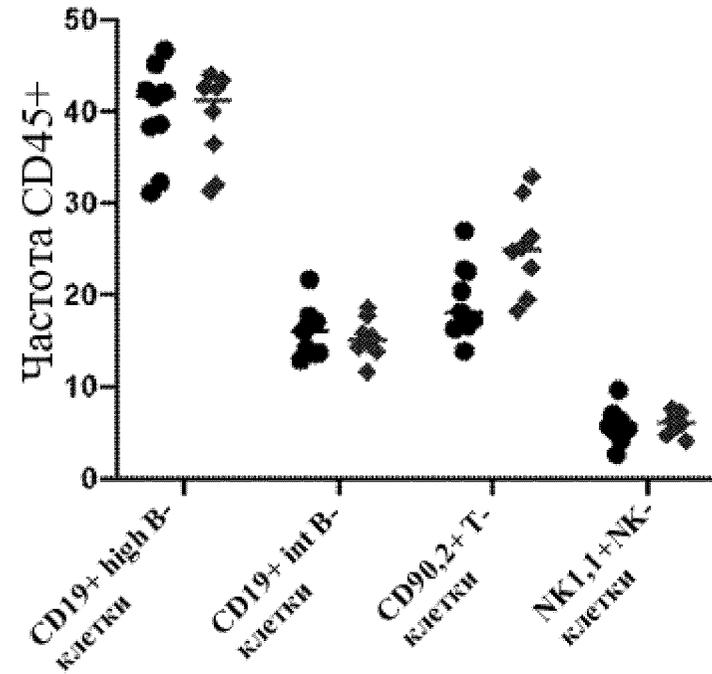


Фиг. 69

Частота CD45+ миелоидных клеток в крови

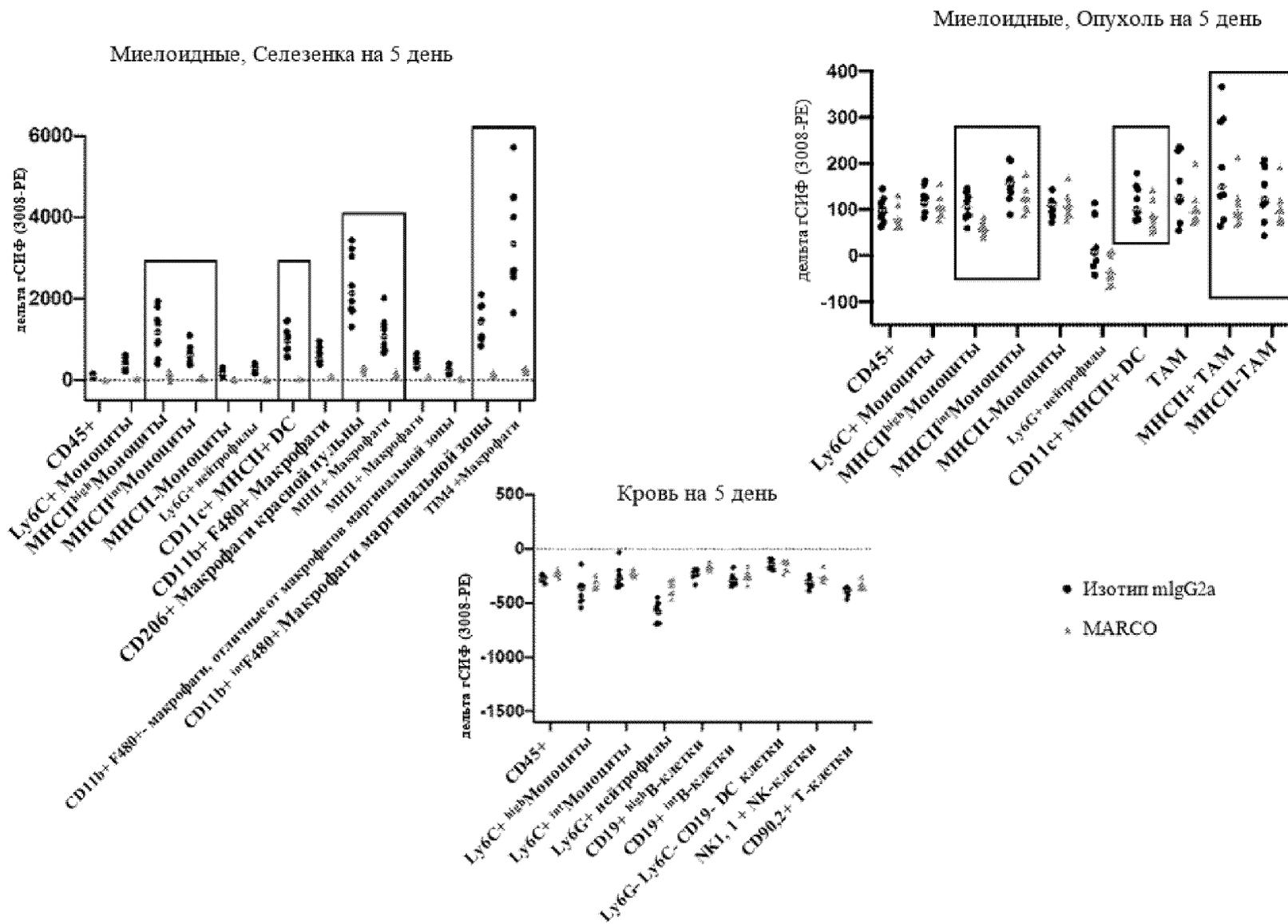


Частота CD45+ T В НК в крови



● Изотип mlgG2a
◆ MARCO

Фиг. 70



Фиг. 71

