

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391217** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.06.21

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.10.21

(54) СОСТАВЫ АНТИТЕЛ К Siglec-8

(31) **63/104,436**

(72) Изобретатель:
Йоуэл Дэн, Касарено Руби (US)

(32) **2020.10.22**

(33) **US**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(86) **PCT/US2021/071958**

(87) **WO 2022/087610 2022.04.28**

(71) Заявитель:
АЛЛАКОС ИНК. (US)

(57) В настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции (например, жидкие составы), содержащие моноклональное антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, для подкожного введения, а также промышленные изделия, связанные с ними.

Путь введения	Дозовая когорта (мг/кг)	n	Исходный уровень	Медианное кол-во эозинофилов крови, 10 ³ /мл					
				1 ч	3 ч	День 15	День 35	День 56	День 85
р/о	10	10	100	100	200	200	100	200	100
	0.3	6	110	200	20	0	0	50	100
	1.0	6	150	0	0	0	0	0	50
	3.0	6	150	0	0	0	0	0	0
п/к	5.0	6	100	0	0	0	0	0	0
	300 мг	6	100	0	0	0	0	0	0
в/в	1.0	6	100	0	0	0	0	0	0
	3.0	12	100	0	0	0	0	0	0

202391217
A1

202391217
A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577985EA/032

СОСТАВЫ АНТИТЕЛ К SIGLEC-8

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США с серийным номером 63/104436, поданной 22 октября 2020 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

ПОДАЧА ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

[0002] Содержание поданного в текстовом файле ASCII полностью включено в данный документ посредством ссылки: машиночитаемая форма (CRF) перечня последовательностей (имя файла: 701712001340SEQLIST.TXT, дата записи: 13 октября 2021 г., размер: 93125 байт).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям (например, жидким составам), содержащим моноклональное антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, для подкожного введения, а также к промышленным изделиям, связанным с ними.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Siglec-8 представляет собой связывающий сиаловую кислоту иммуноглобулин-подобный лектин, специфически экспрессируемый эозинофилами, тучными клетками и базофилами. Наряду с тучными клетками эозинофилы могут способствовать воспалительной реакции, которая играет полезную функциональную роль, например, в борьбе с инфекцией в определенном участке ткани. Было показано, что некоторые заболевания связаны с активацией эозинофилов, такие как синдром Черджа-Стросса, ревматоидный артрит и аллергическая астма (Wechsler et al., J Allergy Clin Immunol., 2012, 130(3):563-71). В настоящее время существует потребность в терапии, которая может контролировать активность иммунных клеток, участвующих в воспалении, таких как активность эозинофилов и тучных клеток. Антитела, распознающие Siglec-8 человека, описаны в патенте США № 8207305, патенте США № 8197811, патенте США № 7871612 и патенте США № 7557191. Гуманизированные антитела к Siglec-8 описаны в патенте США № 9546215.

Составление антител для коммерческого использования требует определения комбинации буфера, pH и необязательных эксципиентов, которые обеспечивают стабильность и растворимость продукта. Кроме того, для подкожного введения требуется, чтобы состав препятствовал агрегации продукта при высокой концентрации, что может привести к образованию больших скоплений продукта, которые закупоривают иглы и/или требуют игл большего диаметра, что может усилить боль или дискомфорт, связанные с введением. Современные коммерческие продукты в высоких концентрациях (например, для подкожного введения), как правило, готовят в гистидиновых буферах с условиями pH 5,5-6,3 и концентрацией сахара 5-9% с дополнительными необязательными

эксципиентами. Состав, подходящий для коммерческого использования, должен поддерживать высокую концентрацию антител в растворе в течение заданного периода времени с незначительным повышением или с полным отсутствием повышения мутности продукта или образования агрегатов.

Не желая быть связанными теорией, считается, что подкожное введение антител к Siglec-8 может быть полезным, например, для снижения частоты и/или степени тяжести реакций, связанных с введением. Таким образом, существует потребность в жидких составах, подходящих для подкожного введения антител к Siglec-8, которые обеспечивают долговременную стабильность и растворимость антитела.

[0004] Все ссылки, цитируемые в данном документе, включая патентные заявки, патентные публикации и научную литературу, полностью включены в данный документ посредством ссылки, как если бы каждая отдельная ссылка была конкретно и отдельно указана для включения посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Для удовлетворения этой и других потребностей настоящее изобретение относится, среди прочего, к фармацевтическим композициям (например, жидким составам) и наборам, содержащим моноклональное антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, для подкожного введения. Они основаны, по меньшей мере частично, на представленной в данном документе демонстрации того, что растворимость некоторых антител к Siglec-8 зависит от pH и конкретного состава буфера. К удивлению, эффект высаливания наблюдали в присутствии аргинина в высокой концентрации, а также наблюдали в присутствии хлорида натрия. Однако другие комбинации буфера, pH и необязательного эксципиента в виде сахара обеспечивали высокие концентрации антител, необходимые для составов для подкожного введения с приемлемой растворимостью и долговременной стабильностью.

[0006] Соответственно, некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к фармацевтическим композициям (например, жидким составам), содержащим моноклональное антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, и гистидин или ацетат натрия в концентрации от около 10 мМ до около 25 мМ. В некоторых вариантах осуществления pH жидкого состава составляет от 5,0 до 6,3. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (1) переменную область тяжелой цепи, содержащую: HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61; HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62; HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63; и (1) переменную область легкой цепи, содержащую: HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64; HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65; и HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66. В некоторых вариантах осуществления антитело содержится в концентрации от около 70 мг/мл до около 210 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело содержится в концентрации от около 100 мг/мл до около 200

мг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело содержится в концентрации от около 125 мг/мл до около 175 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело содержится в концентрации от около 135 мг/мл до около 165 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело содержится в концентрации около 150 мг/мл.

[0007] В некоторых вариантах осуществления состав содержит L-гистидин или гидрохлорид L-гистидина в концентрации около 15 мМ. В некоторых вариантах осуществления рН жидкого состава составляет 6,0.

[0008] В некоторых вариантах осуществления состав содержит ацетат натрия в концентрации около 15 мМ. В некоторых вариантах осуществления рН жидкого состава составляет от около 5,2 до около 5,8. В некоторых вариантах осуществления рН жидкого состава составляет 5,5.

[0009] В некоторых вариантах осуществления состав содержит сахарозу в концентрации от около 5% до около 9%. В некоторых вариантах осуществления состав содержит сахарозу в концентрации от около 5% до около 7,5%. В некоторых вариантах осуществления состав содержит сахарозу в концентрации около 5%.

[0010] В некоторых вариантах осуществления состав содержит трегалозу в концентрации от около 4% до около 10%. В некоторых вариантах осуществления состав содержит трегалозу в концентрации от около 5% до около 7,5%. В некоторых вариантах осуществления состав содержит трегалозу в концентрации 6,6%. В некоторых вариантах осуществления трегалоза представляет собой дигидрат трегалозы.

[0011] В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в данном документе, состав содержит полисорбат-80 в концентрации от около 0,0225% до около 0,0275% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления полисорбат-80 содержится в концентрации около 0,025% (масс./об.).

[0012] В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, в концентрации 150 мг/мл; 15 мМ L-гистидина или гидрохлорида L-гистидина; 175 мМ дигидрата трегалозы; и 0,025% полисорбата-80 (масс./об.); при этом рН жидкого состава составляет 6,0. В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, в концентрации 150 мг/мл; 15 мМ ацетата натрия; 175 мМ дигидрата трегалозы; и 0,025% полисорбата-80 (масс./об.); при этом рН жидкого состава составляет 5,5. В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, в концентрации 150 мг/мл; 15 мМ L-гистидина или гидрохлорида L-гистидина; 5% сахарозы; и 0,025% полисорбата-80 (масс./об.); при этом рН жидкого состава составляет 6,0.

[0013] В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в данном документе, антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6; и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16 или 21. В некоторых вариантах осуществления

антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область Fc тяжелой цепи, включающую область Fc IgG человека. В некоторых вариантах осуществления область Fc IgG человека включает область Fc IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления область Fc IgG1 человека не фукозилирована. В некоторых вариантах осуществления менее около 50% N-связанных гликанов, присоединенных к области Fc антител, в составе, содержат фукозу. В некоторых вариантах осуществления область Fc IgG человека включает область Fc IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления область Fc IgG4 человека содержит аминокислотную замену S228P, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, как в Kabat. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76 или 77. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77. В некоторых вариантах осуществления антитело было сконструировано для улучшения активности антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела не фукозилированы.

[0014] Другие аспекты настоящего изобретения относятся к промышленным изделиям или наборам, включающим контейнер, содержащий состав по любому из вариантов осуществления, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой стеклянный флакон. В некоторых вариантах осуществления промышленные изделия или наборы дополнительно содержат инструкции по подкожному введению состава.

[0015] Следует понимать, что одно, некоторые или все свойства различных вариантов осуществления, описанных в данном документе, могут быть объединены для формирования других вариантов осуществления настоящего изобретения. Эти и другие аспекты настоящего изобретения станут очевидны специалисту в данной области техники. Эти и другие варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно описаны в подробном описании, которое следует ниже.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0016] **На Фиг. 1** показано изменение мутности при концентрации антител в 15 мМ калий-фосфатном буфере при рН 7,2. Показана мутность состава антитела к Siglec-8 при 17,0 мг/мл (слева) или 110,0 мг/мл (справа) антитела.

[0017] **На Фиг. 2** показано изменение мутности при концентрации антител в 15 мМ L-гистидиновом буфере при рН 6,4. Показана мутность состава антитела к Siglec-8 при 11,0 мг/мл (слева) или 185,0 мг/мл (справа) антитела.

[0018] **На Фиг. 3** показано изменение мутности при концентрации антитела в 15 мМ натрий-сукцинатном буфере при рН 6,0. Показана мутность состава антитела к Siglec-8 при 18,0 мг/мл (слева) или 170,0 мг/мл (справа) антитела.

[0019] **На Фиг. 4** показано изменение мутности при концентрации антитела в 15 мМ натрий-сукцинатном буфере при рН 5,6. Показана мутность состава антитела к Siglec-8 при 10,0 мг/мл (слева) или 165,0 мг/мл (справа) антитела.

[0020] **На Фиг. 5** показано изменение мутности при концентрации антитела в 15 мМ натрий-ацетатном буфере при рН 5,0. Показана мутность состава антитела к Siglec-8 при 17,0 мг/мл (слева) или 190,0 мг/мл (справа) антитела.

[0021] **На Фиг. 6** показано сравнение мутности составов антител к Siglec-8 с различными эксципиентами. Во всех образцах использовали 15 мМ калий-фосфатный буфер с рН 7,2. Показаны (слева направо): 110 мг/мл антитела в контрольном составе, 85 мг/мл антитела в составе с 320 мМ аргинина, 70 мг/мл антитела в составе с 540 мМ сахарозы и 80 мг/мл антитела в составе с 500 мМ хлорида натрия.

[0022] **На Фиг. 7** показано сравнение мутности составов антител к Siglec-8 с различными эксципиентами. Во всех образцах использовали 15 мМ гистидиновый буфер с рН 6,4. Показаны (слева направо): 185 мг/мл антитела в контрольном составе, 165 мг/мл антитела в составе с 100 мМ аргинина, 150 мг/мл антитела в составе с 260 мМ сахарозы и 165 мг/мл антитела в составе с 140 мМ хлорида натрия.

[0023] **На Фиг. 8** показано сравнение мутности составов антител к Siglec-8 с различными эксципиентами. Во всех образцах использовали 15 мМ натрий-сукцинатный буфер при рН 5,6. Показаны (слева направо): 165 мг/мл антитела в контрольном составе, 150 мг/мл антитела в составе с 100 мМ аргинина, 130 мг/мл антитела в составе с 260 мМ сахарозы и 150 мг/мл антитела в составе с 140 мМ хлорида натрия.

[0024] **На Фиг. 9** показаны результаты исследования фазы I подкожного введения антитела к Siglec-8. Здоровые добровольцы получали дозы в соответствии со следующими когортами: плацебо вводили п/к, 0,3 мг/кг антитела к Siglec-8 вводили п/к, 1,0 мг/кг антитела к Siglec-8 вводили п/к, 3,0 мг/кг антитела к Siglec-8 вводили п/к, 5,0 мг/кг антитела к Siglec-8 вводили п/к, 300 мг антитела к Siglec-8 вводили п/к, 1,0 мг/кг антитела к Siglec-8 вводили в/в и 3,0 мг/кг антитела к Siglec-8 вводили в/в. Число добровольцев в каждой когорте обозначено как n. Для всех когорт среднее количество эозинофилов в крови ($\times 10^3/\text{мл}$) измеряли на момент включения в исследование, через 1 час после введения, через 3 часа после введения, на 15-й день после введения, на 35-й день после

введения, на 56-й день после введения и на 85-й день после введения. п/к: подкожная инъекция; в/в: внутривенная инфузия; РВО: плацебо.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Определения

[0025] Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными композициями или биологическими системами, которые, конечно, могут варьироваться. Также следует понимать, что использованная в данном документе терминология предназначена исключительно для описания конкретных вариантов осуществления, и не предназначена для ограничения настоящего изобретения. Использование в данном описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылку на формы множественного числа, если из содержания явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на «молекулу» необязательно включает комбинацию двух или более таких молекул и тому подобное.

[0026] Термин «около», используемый в данном документе, относится к обычному диапазону погрешностей для соответствующего значения и хорошо известный специалисту в данной области техники. В данном документе применение «около» по отношению к величине или параметру включает (и описывает) варианты осуществления, которые относятся непосредственно к этой величине или параметру по существу.

[0027] Понятно, что аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения включают «содержащие», «состоящие» и «по существу состоящие из» аспектов и вариантов осуществления.

[0028] Термин «антитело» включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (включая полноразмерные антитела, которые имеют область Fc иммуноглобулина), композиции антител с полиэпитопной специфичностью, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, диатела и одноцепочечные молекулы), а также фрагменты антител (например, Fab, F(ab')₂ и Fv). Термин «иммуноглобулин» (Ig) используется в данном документе взаимозаменяемо с термином «антитело».

[0029] Основная 4-цепочечная единица антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Антитела IgM состоят из 5 основных гетеротетрамерных звеньев вместе с дополнительным полипептидом, называемым J-цепью, и содержат 10 антигенсвязывающих сайтов, в то время как антитела IgA содержат от 2 до 5 основных 4-цепочечных звеньев, которые могут полимеризоваться с образованием поливалентных комплексов в сочетании с J-цепью. В случае IgG 4-цепочечная единица в целом имеет массу около 150000 дальтон. Каждая L-цепь связана с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи связаны друг с другом одной или более дисульфидными связями в зависимости от изоформа H-цепи. Каждая H- и L-цепь также содержит расположенные на равном расстоянии друг от друга внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая H-цепь содержит в N-конце вариабельный домен (V_H), за

которым следуют три константных домена (C_H) в случае каждой из α - и γ -цепей и четыре домена C_H в случае изотипов μ и ϵ . Каждая L-цепь содержит в N-конце переменный домен (V_L), за которым следует константный домен в другом конце. V_L выровнена с V_H , а C_L выровнена с первым константным доменом тяжелой цепи (C_{H1}). Считается, что конкретные аминокислотные остатки образуют поверхность взаимодействия между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи. Спаривание V_H и V_L вместе образует единый антигенсвязывающий сайт. Для получения информации о структуре и свойствах различных классов антител, см, например, Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, страница 71 и глава 6.

[0030] L-цепь любого вида позвоночных может быть отнесена к одному из двух четко отличимых типов, называемых каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (C_H) иммуноглобулины можно отнести к разным классам или изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, тяжелые цепи которых обозначаются α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Классы γ и α дополнительно делятся на подклассы на основе относительно незначительных различий в последовательности и функции C_H , например, у человека экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Антитела IgG1 могут существовать в виде нескольких полиморфных вариантах, называемых аллотипами (обзор приведен в Jefferis and Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4 1-7), любой из которых подходит для использования в настоящем изобретении. Распространенные аллотипические варианты в человеческих популяциях обозначаются буквами a, f, n, z.

[0031] «Выделенное» антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано, отделено и/или извлечено из компонента его производственной среды (например, естественным или рекомбинантным путем). В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид не связан со всеми другими компонентами его производственной среды. Загрязняющие компоненты его производственной среды, такие как продукты рекомбинантных трансфицированных клеток, представляют собой материалы, которые, как правило, препятствуют исследовательскому, диагностическому или терапевтическому применению антитела и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В некоторых вариантах осуществления полипептид очищен: (1) до более 95% по массе антитела, как определено, например, методом Лоури, и в некоторых вариантах осуществления до более 99% по массе; (1) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности, используя секвенатор с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в невозстанавливающих или восстанавливающих условиях с использованием Кумасси синего или, предпочтительно, красителя на основе серебра. Выделенное антитело

включает в себя антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент естественной среды антитела будет отсутствовать. Однако обычно выделенный полипептид или антитело получают по меньшей мере с помощью одной стадии очистки.

[0032] Термин «моноклональное антитело», используемый в данном документе, относится к антителу, полученному из множества по существу гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела имеют С-концевое расщепление на тяжелой цепи и/или легкой цепи. Например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков отщепляются на С-конце тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления С-концевое расщепление удаляет С-концевой лизин из тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела имеют N-концевое расщепление в тяжелой цепи и/или легкой цепи. Например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков отщепляются на N-конце тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела являются высокоспецифичными, поскольку они направлены против одного антигенного сайта. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела являются высокоспецифичными, направленными против множества антигенных сайтов (например, биспецифическое антитело или полиспецифическое антитело). Модификатор «моноклональный» указывает на характер антитела, получаемого из по существу гомогенного множества антител, и его не следует истолковывать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены различными методиками, включая, например, гибридомный метод, методы рекомбинантной ДНК, технологию фагового дисплея, и технологии получения человеческих или подобных человеческим антител у животных, которые имеют части или все локусы или гены иммуноглобулина человека, кодирующие последовательности иммуноглобулина человека.

[0033] Термин «голое антитело» относится к антителу, которое не конъюгировано с цитотоксическим фрагментом или радиоактивной меткой.

[0034] Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» или «полное антитело» используются взаимозаменяемо для обозначения антитела в его по существу интактной форме, в отличие от фрагмента антитела. В частности, полные антитела включают антитела с тяжелыми и легкими цепями, включая область Fc. Константные домены могут представлять собой константные домены с нативной последовательностью (например, константные домены человеческой с нативной последовательностью) или их варианты аминокислотной последовательности. В некоторых случаях интактное антитело может выполнять одну или более эффекторных функций.

[0035] «Фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, антигенсвязывающую и/или переменную область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv; диатела; линейные антитела (см. патент США 5641870, пример 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0036] При расщеплении антител папаином образуются два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемые фрагментами «Fab», и остаточный фрагмент «Fc», название которого отражает его способность к легкой кристаллизации. Фрагмент Fab состоит из целой L-цепи вместе с доменом переменной области H-цепи (V_H) и первым константным доменом одной тяжелой цепи (C_{H1}). Каждый фрагмент Fab является моновалентным по отношению к связыванию антигена, то есть он имеет единственный антигенсвязывающий сайт. Обработка антитела пепсином позволяет выделить одиночный большой фрагмент F(ab')₂, который приблизительно соответствует двум фрагментам Fab, и все еще способным к сшиванию антигена. Фрагменты Fab' отличаются от фрагментов Fab тем, что имеют несколько дополнительных остатков на C-конце домена C_{H1}, включая один или более цистеинов из шарнирной области антитела. В данном документе Fab'-SH является обозначением для фрагмента Fab', в котором цистеиновые остатки константных доменов несут свободную тиольную группу. Фрагменты F(ab')₂ антитела первоначально получали в виде пар фрагментов Fab', которые имеют шарнирные цистеины между ними. Также известны другие химические соединения фрагментов антитела.

[0037] Фрагмент Fc включает C-концевые части обеих H-цепей, удерживаемые вместе дисульфидами. Эффекторные функции антител определяются последовательностями в области Fc, области, которая также распознается Fc-рецепторами (FcR), обнаруженными на определенных типах клеток.

[0038] «Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный сайт распознавания и связывания антигена. Этот фрагмент состоит из димера одного домена переменной области тяжелой цепи и одного домена переменной области легкой цепи, жестко связанных посредством нековалентных связей. При фолдинге этих двух доменов наружу выступают шесть гиперпеременных петель (по 3 петли на каждой H- и L-цепи), аминокислотные остатки которых участвуют в связывании антигена и придают антителу специфичность по отношению к связыванию антигена. В то же время даже один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три HVR, специфичные к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя с более низкой аффинностью, чем целый сайт связывания.

[0039] «Одноцепочечные Fv», также имеющие аббревиатуру «sFv» или «scFv», представляют собой фрагменты антител, которые содержат домены антител V_H и V_L, связанные в одну полипептидную цепь. В некоторых вариантах осуществления полипептид sFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L, дающий возможность sFv образовывать требуемую структуру для связывания

антигена. Обзор по sFv см. у Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

[0040] «Функциональные фрагменты» антител по настоящему изобретению содержат часть интактного антитела, как правило, содержащую антигенсвязывающую или переменную область интактного антитела или область Fv антитела, которая сохраняет или модифицирует способность связывания FcR. Примеры фрагментов антител включают линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0041] Моноклональные антитела в данном документе конкретно включают «химерные» антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от определенного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, а остальная часть цепи (цепей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность (патент США № 4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Представляющие интерес химерные антитела включают антитела PRIMATIZED[®], в которых антигенсвязывающая область антитела происходит из антитела, получаемого, например, при помощи иммунизации макака представляющим интерес антигеном. В контексте данного документа термин «гуманизованное антитело» означает подмножество «химерных антител».

[0042] «Гуманизованные» формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. В одном варианте гуманизованное антитело представляет собой человеческий иммуноглобулин (реципиентное антитело), в котором остатки из HVR реципиента заменены остатками из HVR нечеловеческого вида (донорное антитело), такого как мышь, крыса, кролик или отличный от человека примат, имеющий желаемую специфичность, аффинность и/или активность. В некоторых случаях, остатки FR человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими нечеловеческими остатками. Кроме того, гуманизованные антитела могут содержать остатки, отсутствующие в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации могут быть сделаны для дальнейшего улучшения характеристик антител, таких как аффинность связывания. Как правило, гуманизованное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, а, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все гиперпеременные петли соответствуют гиперпеременным петлям последовательности нечеловеческого иммуноглобулина, и все или по существу все области FR представляют собой области последовательности иммуноглобулина человека, хотя области FR могут включать одну или более замен отдельных остатков FR, которые улучшают

характеристики антитела, такие как аффинность связывания, изомеризация, иммуногенность и т. д. В некоторых вариантах осуществления количество этих аминокислотных замен в FR составляет не более 6 в H-цепи и не более 3 в L-цепи. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Для получения дополнительной информации, см., например, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). См. также, например, Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); и патенты США №№ 6982321 и 7087409. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела направлены против одного антигенного сайта. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела направлены против нескольких антигенных сайтов. Альтернативный способ гуманизации описан в патенте США № 7981843 и публикации заявки на патент США № 2006/0134098.

[0043] «Вариабельная область» или «вариабельный домен» антитела относится к аминоконцевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи могут обозначаться как «VH» и «VL», соответственно. Эти домены в целом являются наиболее вариабельными частями антитела (по сравнению с другими антителами того же класса) и содержат сайты связывания антигена.

[0044] В контексте данного документа термин «гипервариабельная область», «HVR» или «HV» относится к областям вариабельного домена антитела, которые являются гипервариабельными по последовательности и/или образуют структурно определенные петли. В целом, антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). В нативных антителах H3 и L3 демонстрируют наибольшее разнообразие из шести HVR, и, как полагают, в частности, H3 играет уникальную роль в придании высокой специфичности антителам. См., например, Xu et al. *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson and Wu in *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)). Действительно, встречающиеся в природе антитела верблюдовых, состоящие только из тяжелых цепей, являются функциональными и стабильными без легкой цепи. См., например, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993) and Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

[0045] Применяют большое число вариантов разграничения HVR, которые включены в данный документ. HVR, которые представляют собой определяющие комплементарность области (CDR) по Kabat, основаны на вариабельности последовательностей и являются наиболее часто используемыми (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Вместо этого HVR по Chothia относятся к расположению структурных петель (Chothia and Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). HVR по «Contact»

определяют в анализе доступных кристаллических структур комплексов. Остатки из каждой из этих HVR приведены ниже.

<u>Петля</u>	<u>Kabat</u>	<u>Chothia</u>	<u>Contact</u>
L1	L24-L34	L26-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H32	H30-H35B (нумерация по Kabat)
H1	H31-H35	H26-H32	H30-H35 (нумерация по Chothia)
H2	H50-H65	H53-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H93-H101

[0046] Если не указано иное, остатки варибельного домена (остатки HVR и остатки каркасной области) пронумерованы в соответствии с Kabat et al., см. выше.

[0047] Остатки «каркасной области» или «FR» представляют собой остатки варибельного домена, отличные от остатков HVR, как определено в данном документе.

[0048] Выражения «нумерация остатков варибельного домена по Kabat» или «нумерация аминокислотных положений по Kabat» и их вариации относятся к системе нумерации, используемой для варибельных доменов тяжелой цепи или варибельных доменов легкой цепи при составлении антител в Kabat et al., *выше*. При использовании этой системы нумерации, фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньше или больше аминокислот, что соответствует укорочению или вставкам в FR или HVR варибельного домена. Например, варибельный домен тяжелой цепи может содержать вставку одной аминокислоты (остаток 52a в соответствии с Kabat) после остатка 52 H2 и вставленные остатки (например остатки 82a, 82b, 82c и т. д. в соответствии с Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Kabat может быть определена для данного антитела путем выравнивания гомологичных областей последовательности антитела со «стандартной» пронумерованной последовательностью по Kabat.

[0049] «Акцепторная каркасная область человека» для целей данного документа представляет собой каркасную область, содержащую аминокислотную последовательность каркасной последовательности VL или VH, полученной из каркасной последовательности иммуноглобулина человека или консенсусной каркасной последовательности человека. Акцепторная каркасная область человека, «полученная из» каркасной области иммуноглобулина человека или консенсусной каркасной области человека, может содержать такую же аминокислотную последовательность, или она может содержать ранее существовавшие изменения аминокислотной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления количество ранее существовавших аминокислотных замен составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее, или 2 или менее.

[0050] «Процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей» относительно эталонной полипептидной последовательности определяется как процентная доля аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые являются идентичными с аминокислотными остатками в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и внесения, в случае необходимости, гэпов для достижения максимальной идентичности последовательностей, но без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может осуществляться различными способами, которые известны специалистам в данной области техники, например, с использованием общедоступных компьютерных программ, таких как программные обеспечения BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Например, % идентичности данной аминокислотной последовательности А к, с, или по отношению к данной аминокислотной последовательности В (что в альтернативном варианте может быть сформулировано как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности к, с или по отношению к данной аминокислотной последовательности В) рассчитывают следующим образом:

$100 \times \frac{X}{Y}$ умножить на соотношение X/Y

где X представляет собой число аминокислотных остатков, оцененных как идентичные совпадения последовательностей при программном выравнивании А и В, и где Y представляет общее количество аминокислотных остатков в В. Следует понимать, что там, где длина аминокислотной последовательности А не равняется длине аминокислотной последовательности В, % идентичности аминокислотной последовательности А к В не будет равен % идентичности аминокислотной последовательности В к А.

[0051] Антитело, которое «связывается с», «специфически связывается» или является «специфическим для» конкретного полипептида или эпитопа на конкретном полипептиде, представляет собой антитело, которое связывается с этим конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде, по существу не связываясь с каким-либо другим полипептидом или полипептидным эпитопом. В некоторых вариантах осуществления связывание антитела к Siglec-8, описанного в данном документе, (например, антитела, которое связывается с Siglec-8 человека) с неродственным полипептидом, отличным от Siglec-8, составляет менее около 10% связывания антитела с

Siglec-8, при измерении методами, известными в данной области техники (например, твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА)). В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), имеет константу диссоциации (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,7$ нМ, $\leq 0,6$ нМ, $\leq 0,5$ нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} нМ или меньше, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М).

[0052] Термин «антитело к Siglec-8» или «антитело, которое связывается с Siglec-8 человека» относится к антителу, которое связывается с полипептидом или эпитопом Siglec-8 человека без существенного связывания с каким-либо другим полипептидом или эпитопом неродственного полипептида, отличного от Siglec-8.

[0053] В контексте данного документа термин «Siglec-8» относится к белку Siglec-8 человека. Термин также включает природные варианты Siglec-8, в том числе сплайс-варианты или аллельные варианты. Аминокислотная последовательность иллюстративного Siglec-8 человека показана в SEQ ID NO:72. Аминокислотная последовательность другого иллюстративного Siglec-8 человека показана в SEQ ID NO:73. В некоторых вариантах осуществления белок Siglec-8 человека содержит внеклеточный домен Siglec-8 человека, слитый с областью Fc иммуноглобулина. Аминокислотная последовательность иллюстративного внеклеточного домена Siglec-8 человека, слитого с областью Fc иммуноглобулина, показана в SEQ ID NO:74. Аминокислотная последовательность, подчеркнутая в SEQ ID NO:74, указывает на аминокислотную последовательность области Fc из Fc-слитого белка Siglec-8.

Аминокислотная последовательность Siglec-8 человека

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSPQDGTSDPVGHWYFRAGDRPYQDAP
 VATNNDREVQAETQGRFQLLGDIVSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGS MKWSYK
 SQLNYKTKQLSVFVTALHTRPDILILGTLES GHSRNLTCVWPWACKQGTTPMISWIGASV
 SSPGPTTARSSVLTLPKPDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPWNLTMTVFQ
 GDATASTALGNSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELP
 RVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEG TGTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFL
 SFCIIFIIVRSCRKKSARPAAGVGD TGME DAKAIRGSASQGPLTESWKDGNPLKPPPAV
 APSSGEEGELHYATLSFHKVKPQDPQGQEATDSEYSEIKHKRETAETQA CLRNHNPSK
 EVRG (SEQ ID NO:72)

Аминокислотная последовательность Siglec-8 человека

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSPQDGTSDPVGHWYFRAGDRPYQDAP
 VATNNDREVQAETQGRFQLLGDIVSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGS MKWSYK
 SQLNYKTKQLSVFVTALHTRPDILILGTLES GHPRNLTCVWPWACKQGTTPMISWIGASV
 SSPGPTTARSSVLTLPKPDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPWNLTMTVFQ
 GDATASTALGNSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELP
 RVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEG TGTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFL
 SFCIIFIIVRSCRKKSARPAAGVGD TGME DAKAIRGSASQGPLTESWKDGNPLKPPPAV

APSSGEEGELHYATLSFHKVKPQDPQGQEATDSEYSEIKIHKRETAETQAACLRNHNPPSSK
EVRG (SEQ ID NO:73)

Аминокислотная последовательность Fc-слитого белка Siglec-8

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPSCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDRPYQDAP
VATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIEWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGS MKWSYK
SQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLES GHSRNLTCVSPWACKQGTTPMISWIGASV
SSPGPTTARSSVLTLPKPDHGTSLTCQVTLPGTGVTTTSTVRLDVSYPWNLTMTVFQ
GDATASTALGNSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELP
RVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGIEGRSDKTH
TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:74)

[0054] Антитела, которые «индуцируют апоптоз» или являются «апоптотическими», представляют собой антитела, вызывающие запрограммированную гибель клеток, что определяется стандартными анализами апоптоза, такими как связывание аннексина V, фрагментация ДНК, сжатие клеток, расширение эндоплазматического ретикулума, фрагментация клеток и/или образование мембранных везикул (называемых апоптозными тельцами). Например, апоптотическая активность антител к Siglec-8 (например, антитела, которое связывается с Siglec-8 человека) по настоящему изобретению может быть продемонстрирована путем окрашивания клеток аннексином V.

[0055] «Эффекторные функции» антитела относятся к той биологической активности, которая относится к области Fc (например, нативной последовательности области Fc или аминокислотной последовательности вариантной области Fc) антитела, и варьируются в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антител включают: связывание C1q и комплемент-зависимую цитотоксичность; связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; снижение экспрессии рецепторов клеточной поверхности (например, рецепторов В-клеток); и активацию В-клеток.

[0056] «Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «АЗКЦ» относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig, связанный с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, натуральных клетках-киллерах (NK-клетках), нейтрофилах и макрофагах), позволяет этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с несущей антиген целевой клеткой и впоследствии уничтожать целевую клетку цитотоксинами. Антитела «приводят в готовность» цитотоксические клетки и необходимы для уничтожения клетки-мишени посредством этого механизма. Первичные клетки для опосредования АЗКЦ, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия Fc на гемопоэтических

клетках приведена в таблице 3 на странице 464 в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе антитело к Siglec-8 (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека) усиливает АЗКЦ. 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 моноклеарные клетки периферической крови (РВМС) и натуральные клетки-киллеры (NK). В качестве альтернативы или дополнения, активность АЗКЦ представляющей интерес молекулы можно оценить *in vivo*, например, в животной модели, например, согласно описанию в публикации Clynes et al., *PNAS USA* 95:652-656 (1998). Другие варианты Fc, которые изменяют активность АЗКЦ и другие свойства антител, включают варианты, описанные Ghetie et al., *Nat Biotech.* 15:637-40, 1997; Duncan et al, *Nature* 332:563-564, 1988; Lund et al., *J. Immunol* 147:2657-2662, 1991; Lund et al, *Mol Immunol* 29:53-59, 1992; Alegre et al, *Transplantation* 57:1537-1543, 1994; Hutchins et al., *Proc Natl. Acad Sci USA* 92:11980-11984, 1995; Jefferis et al, *Immunol Lett.* 44:111-117, 1995; Lund et al., *FASEB J*9:115-119, 1995; Jefferis et al, *Immunol Lett* 54:101-104, 1996; Lund et al, *J Immunol* 157:4963-4969, 1996; Armour et al., *Eur J Immunol* 29:2613-2624, 1999; Idusogie et al, *J Immunol* 164:4178-4184, 2000; Reddy et al, *J Immunol* 164:1925-1933, 2000; Xu et al., *Cell Immunol* 200:16-26, 2000; Idusogie et al, *J Immunol* 166:2571-2575, 2001; Shields et al., *J Biol Chem* 276:6591-6604, 2001; Jefferis et al, *Immunol Lett* 82:57-65. 2002; Presta et al., *Biochem Soc Trans* 30:487-490, 2002; Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005-4010, 2006; патенты США №№ 5624821; 5885573; 5677425; 6165745; 6277375; 5869046; 6121022; 5624821; 5648260; 6194551; 6737056; 6821505; 6277375; 7335742; и 7317091.

[0057] Термин «область Fc» в данном документе используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая области Fc с нативной последовательностью и вариантные области Fc. Хотя границы области Fc тяжелой цепи иммуноглобулин могут варьироваться, область Fc тяжелой цепи человеческого IgG обычно определяют как участок от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до его C-конца. Подходящие области Fc с нативной последовательностью для применения в антителах по настоящему изобретению включают области из человеческих IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Для устранения гетерогенности, наблюдаемой в рекомбинантном антителе IgG4, может быть введена одна аминокислотная замена (S228P по нумерации Kabat; обозначенная как IgG4Pro). См. Angal, S. et al. (1993) *Mol Immunol* 30, 105-108.

[0058] «Нефукозилированное» или «фукозодефицитное» антитело относится к гликозилированному варианту антитела, содержащему область Fc, в котором углеводная структура, присоединенная к области Fc, имеет сниженное количество фукозы или не содержит фукозу. В некоторых вариантах осуществления антитело с пониженным содержанием фукозы или без фукозы обладает улучшенной функцией АЗКЦ. Нефукозилированные или дефицитные по фукозе антитела имеют пониженное содержание фукозы по сравнению с количеством фукозы в том же антителе,

продуцируемом в линии клеток. В некоторых вариантах осуществления рассматриваемая в данном документе композиция нефукозилированного или дефицитного по фукозе антитела представляет собой композицию, в которой менее около 50% N-связанных гликанов, присоединенных к области Fc антител в композиции, содержат фукозу.

[0059] Термины «фукозилирование» или «фукозилированный» относятся к присутствию остатков фукозы в составе олигосахаридов, присоединенных к пептидному остову антитела. В частности, фукозилированное антитело содержит α -(1,6)-связанную фукозу на самом внутреннем остатке N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) в одном или обоих N-связанных олигосахаридах, присоединенных к области Fc антитела, например в положении Asn 297 домена Fc IgG1 человека (нумерация EU остатков области Fc). Asn297 также может быть расположен примерно на+3 аминокислоты выше или ниже положения 297, то есть между положениями 294 и 300, из-за незначительных вариаций последовательности в иммуноглобулинах.

[0060] «Степень фукозилирования» представляет собой процентное содержание фукозилированных олигосахаридов относительно всех олигосахаридов, идентифицированных методами, известными в данной области техники, например, в композиции антитела, обработанной N-гликозидазой F, оцениваемой с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS). В составе «полностью фукозилированного антитела» по существу все олигосахариды содержат остатки фукозы, т.е. являются фукозилированными. В некоторых вариантах осуществления композиция полностью фукозилированного антитела имеет степень фукозилирования по меньшей мере около 90%. Соответственно, отдельное антитело в такой композиции, как правило, содержит остатки фукозы в каждом из двух N-связанных олигосахаридов в области Fc. Наоборот, в композиции «полностью нефукозилированного» антитела по существу ни один из олигосахаридов не является фукозилированным, и отдельное антитело в такой композиции не содержит остатков фукозы ни в одном из двух N-связанных олигосахаридов в области Fc. В некоторых вариантах осуществления композиция полностью нефукозилированного антитела имеет степень фукозилирования менее около 10%. В составе «частично фукозилированного антитела» только часть олигосахаридов содержит фукозу. Отдельное антитело в такой композиции может содержать остатки фукозы ни в одном из N-связанных олигосахаридов, или в обоих, или в обоих из N-связанных олигосахаридов в области Fc, при условии, что композиция не содержит по существу все отдельные антитела, в которых отсутствуют остатки фукозы в N-связанных олигосахаридах в области Fc, а также по существу все отдельные антитела, которые содержат остатки фукозы в обоих N-связанных олигосахаридах в области Fc. В одном варианте осуществления композиция частично фукозилированного антитела имеет степень фукозилирования от около 10% до около 80% (например, от около 50% до около 80%, от около 60% до около 80% или от около 70% до около 80%).

[0061] «Аффинность связывания», как используется в данном документе, относится к силе нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и его партнером по связыванию (например, антигеном). В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания антитела с Siglec-8 (который может представлять собой димер, такой как слитый белок Siglec-8-Fc, описанный в данном документе) обычно может быть представлена в виде константы диссоциации (Kd). Аффинность можно измерить с помощью общепринятых в данной области техники способов, в том числе тех, которые описаны в данном документе.

[0062] В контексте данного документа «авидность связывания» относится к силе связывания нескольких сайтов связывания молекулы (например, антитела) и ее партнера по связыванию (например, антигена).

[0063] «Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитела в данном документе, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена по меньшей мере от одной загрязняющей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в среде, в которой она была продуцирована. В некоторых вариантах выделенная нуклеиновая кислота не ассоциирована со всеми компонентами, связанными с производственной средой. В данном документе выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды и антитела, находятся в форме, отличной от формы или условий, в которых они встречаются в природе. Таким образом, выделенные молекулы нуклеиновой кислоты отличаются от нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды и антитела, которые в данном документе естественным образом присутствуют в клетках.

[0064] Термин «фармацевтический состав» относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для индивида, которому будет вводиться состав. Такие составы являются стерильными. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав представляет собой жидкий состав.

[0065] В контексте данного документа термин «лечение» или «процесс лечения» относится к клиническому вмешательству, предназначенному для изменения естественного течения хода клинической патологии индивида или клетки, которые подвергаются лечению. Желательные эффекты лечения включают снижение скорости прогрессирования заболевания, облегчение или смягчение болезненного состояния, ремиссию или улучшение прогноза. Индивид успешно поддается «лечению», например, если один или более симптомов, связанных с заболеванием, смягчены или устранены. Например, индивид успешно поддается «лечению», если лечение приводит к повышению качества жизни страдающих от заболевания, снижению дозы других лекарственных препаратов, необходимых для лечения заболевания, уменьшения частоты рецидивов заболевания, уменьшения степени тяжести заболевания, задержке развития или прогрессирования заболевания и/или продлению выживания индивидов.

[0066] В контексте данного документа термин «в сочетании с» или «в комбинации с» относится к применению одного способа лечения в дополнение к другому способу лечения. Таким образом, «в сочетании с» или «в комбинации» относится к применению одного способа лечения до, во время или после применения другого способа лечения для индивида.

[0067] В контексте данного документа термин «профилактика» или «предупреждение» включает обеспечение профилактики в отношении возникновения или рецидива заболевания у индивида. Индивид может быть предрасположен к заболеванию, восприимчив к заболеванию или подвергаться риску развития заболевания, но у него еще не диагностировано заболевание. В некоторых вариантах осуществления антитела к Siglec-8 (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), описанные в данном документе, используются для задержки развития заболевания.

[0068] В контексте данного документа индивид, «подверженный риску» развития заболевания, может иметь или не иметь выявляемое заболевание или симптомы заболевания, а также может проявлять или не проявлять выявляемое заболевание или симптомы заболевания до применения способов лечения, описанных в данном документе. «Подверженный риску» означает наличие у индивида одного или более факторов риска, которые представляют собой измеримые параметры, коррелирующие с развитием заболевания, как известно в данной области техники. У индивида, имеющего один или более из этих факторов риска, вероятность развития заболевания выше, чем у индивида без одного или более из этих факторов риска.

[0069] Термин «листок-вкладыш» используется для обозначения инструкций, которые обычно вкладывают в коммерческие упаковки терапевтических продуктов для продажи, содержащие информацию о показаниях, использовании, дозах, приеме, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях, которые касаются использования таких терапевтических продуктов.

[0070] В контексте данного документа термин «индивид» или «субъект» представляет собой млекопитающее. «Млекопитающие» в целях лечения включают людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных зоопарка, спортивных или домашних животных, таких как собаки, лошади, кролики, крупный рогатый скот, свиньи, хомяки, песчанки, мыши, хорьки, крысы, кошки и т. д. В некоторых вариантах осуществления индивид или субъект представляет собой человека.

II. Композиции

В некоторых аспектах в данном документе также предложены композиции (например, фармацевтические композиции, такие как жидкие составы), содержащие любое из антител к Siglec-8, описанных в данном документе (например, антитело, которое связывается с Siglec-8). В некоторых вариантах осуществления композиция предназначена для подкожного введения. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложен жидкий состав, содержащий: (а) моноклональное антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, причем антитело содержится в концентрации от около 70

мг/мл до около 210 мг/мл; и (b) гистидин или ацетат натрия в концентрации около 15 мМ. В некоторых вариантах осуществления рН жидкого состава составляет от 5,0 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (1) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1; HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2; HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3; и (1) вариабельную область легкой цепи, содержащую: HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4; HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5; и HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и/или вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 21. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76 или 77. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит область Fc и связанные с N-гликозидом углеводные цепи, связанные с областью Fc, где менее около 50% связанных с N-гликозидом углеводных цепей содержат остаток фукозы. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела не фукозилированы. В некоторых вариантах осуществления по существу ни одна из связанных с N-гликозидом углеводных цепей не содержит остаток фукозы. В некоторых вариантах осуществления область Fc представляет собой область Fc IgG человека (например, IgG1 или IgG4 человека, как описано в данном документе).

Терапевтические составы готовят для хранения путем смешивания активного ингредиента, имеющего желаемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Pub., Gennaro Ed., Philadelphia, Pa. 2000). Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы

нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту, метионин, витамин Е, метабисульфит натрия; консерванты, изотонические вещества, стабилизаторы, металл-содержащие комплексы (например, Zn-белковые комплексы); хелатирующие агенты, такие как ЭДТА и/или неионогенные поверхностно-активные вещества. Примеры составов описаны в данном документе.

Настоящая заявка демонстрирует составы, подходящие для антитела к Siglec-8 в высоких концентрациях, достаточных для подкожного введения без появления мутности или образования геля. В некоторых вариантах осуществления концентрация антитела составляет от около 70 мг/мл до около 210 мг/мл, от около 70 мг/мл до около 175 мг/мл, от около 90 мг/мл до около 210 мг/мл, от около 100 мг/мл до около 210 мг/мл, от около 100 мг/мл до около 200 мг/мл, от около 100 мг/мл до около 150 мг/мл, от около 125 мг/мл до около 210 мг/мл, от около 140 мг/мл до около 210 мг/мл, от около 100 мг/мл до около 175 мг/мл, от около 125 мг/мл до около 175 мг/мл или от около 135 мг/мл до около 165 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация антитела представляет собой любую концентрацию в пределах диапазона, имеющего верхний предел (в мг/мл), выбранный из любого из около: 210, 200, 190, 180, 170 и 160; и независимо выбранный нижний предел (в мг/мл), выбранный из любого из около: 90, 100, 110, 120, 130 и 140; при этом верхний предел больше нижнего предела. В некоторых вариантах осуществления антитело содержится в концентрации, выбранной из любой из около 90 мг/мл, 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл, 150 мг/мл, 160 мг/мл, 170 мг/мл, 180 мг/мл, 190 мг/мл, 200 мг/мл или 210 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело находится в концентрации (в мг/мл), выбранной из по меньшей мере любой из около: 90, 100, 110, 120, 130 и 140; и необязательно менее около 210 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления антитело содержится в концентрации около 150 мг/мл.

Буферы можно использовать для регулирования pH в диапазоне, который оптимизирует терапевтическую эффективность, особенно если стабильность зависит от pH. Настоящая заявка демонстрирует, что некоторые буферы обеспечивают получение стабильных, растворимых составов с высокой концентрацией определенных антител к Siglec-8, в то время как другие буферы приводят к неприемлемому образованию геля или появлению мутности. В некоторых вариантах осуществления состав содержит гистидин или ацетат натрия.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит гистидин. В некоторых вариантах осуществления состав содержит L-гистидин или его соль (например, гидрохлорид L-гистидина). В некоторых вариантах осуществления состав содержит L-гистидин или его соль (например, гидрохлорид L-гистидина) в концентрации от около 10 мМ до около 25 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав содержит L-гистидин или его соль (например, гидрохлорид L-гистидина) в концентрации от около 10 мМ до около 15 мМ, от около 10 мМ до около 20 мМ, от около 10 мМ до около 25 мМ, от около 15 мМ до около 20 мМ, от около 15 мМ до около 25 мМ или выбранной из любой из около

10 мМ, 12,5 мМ, 15 мМ, 17,5 мМ, 20 мМ, 22,5 мМ или 25 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав содержит L-гистидин или его соль (например, гидрохлорид L-гистидина) в концентрации около 15 мМ.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит ацетат натрия. В некоторых вариантах осуществления состав содержит ацетат натрия в концентрации от около 10 мМ до около 25 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав содержит ацетат натрия в концентрации, выбранной из от около 10 мМ до около 15 мМ, от около 10 мМ до около 20 мМ, от около 10 мМ до около 25 мМ, от около 15 мМ до около 20 мМ, от около 15 мМ до около 25 мМ или из любой из около 10 мМ, 12,5 мМ, 15 мМ, 17,5 мМ, 20 мМ, 22,5 мМ или 25 мМ. В некоторых вариантах осуществления состав содержит ацетат натрия в концентрации около 15 мМ.

В некоторых вариантах осуществления рН состава составляет от 5,0 до 6,3. В некоторых вариантах осуществления рН состава составляет от 5,2 до 6,3, от 5,4 до 6,3, от 5,5 до 6,3, от 5,2 до 6,0, от 5,4 до 6,0, от 5,5 до 6,0 или любой из 5,0, 5,2, 5,4, 5,6, 5,8, 6,0, 6,2 или 6,3. В некоторых вариантах осуществления состав содержит гистидин (например, L-гистидин или его соль, такую как гидрохлорид L-гистидина), а рН жидкого состава составляет 6,0. В некоторых вариантах осуществления состав содержит ацетат натрия, а рН жидкого состава составляет от около 5,2 до около 5,8, например, 5,5.

Дополнительные эксципиенты включают агенты, которые могут служить в качестве одного или более из следующего: (1) объемобразующих агентов, (2) усилителей растворимости, (3) стабилизаторов и (4) и агентов, предотвращающих денатурацию или прилипание к стенке контейнера. Неожиданно настоящая заявка демонстрирует, что некоторые эксципиенты не подходят для составов с высокой концентрацией определенных антител к Siglec-8. Например, эффект высаливания наблюдался в присутствии аргинина в высокой концентрации, а также наблюдался в присутствии хлорида натрия.

В некоторых вариантах осуществления состав дополнительно содержит сахар. В некоторых вариантах осуществления состав дополнительно содержит трегалозу (например, дигидрат трегалозы). В некоторых вариантах осуществления состав дополнительно содержит трегалозу (например, дигидрат трегалозы) в концентрации, выбранной из от около 4% до около 10%, от около 5% до около 10%, от около 4% до около 7,5%, от около 5% до около 7,5%, от около 4% до около 6%, от около 5% до около 7,5%, от около 6% до около 10%, от около 6% до около 7,5% или из любой из около: 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,6%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5% или 10%. В некоторых вариантах осуществления состав дополнительно содержит дигидрат трегалозы в концентрации, выбранной из от около 100 мМ до около 300 мМ, от около 115 мМ до около 290 мМ, от около 145 мМ до около 290 мМ, от около 115 мМ до около 220 мМ, от около 145 мМ до около 220 мМ, от около 115 мМ до около 175 мМ, от около 145 мМ до около 220 мМ, от около 175 мМ до около 300 мМ, от около 150 мМ до около 220 мМ, от около 150 мМ до около 200 мМ или из любой из около: 100 мМ, 115 мМ, 120 мМ, 125 мМ, 130 мМ, 145 мМ,

150 мМ, 165 мМ, 170 мМ, 175 мМ, 180 мМ, 190 мМ, 200 мМ, 210 мМ, 215 мМ, 220 мМ, 225 мМ, 230 мМ, 235 мМ, 240 мМ, 250 мМ, 255 мМ, 260 мМ, 270 мМ, 275 мМ, 290 мМ или 300 мМ.

В некоторых вариантах осуществления состав дополнительно содержит сахарозу. В некоторых вариантах осуществления состав дополнительно содержит сахарозу в концентрации, выбранной из от около 4% до около 10%, от около 5% до около 10%, от около 4% до около 7,5%, от около 5% до около 7,5%, от около 4% до около 6%, от около 5% до около 7,5%, от около 6% до около 10%, от около 6% до около 7,5% или из любой из около: 4%, 4,5%, 5%, 5,5%, 6%, 6,6%, 7%, 7,5%, 8%, 8,5%, 9%, 9,5%, или 10%.

Неионные поверхностно-активные вещества или детергенты (также известные как «смачивающие агенты») могут присутствовать, чтобы способствовать сольюбилизации терапевтического агента, а также для защиты терапевтического белка от агрегации, вызванной перемешиванием, что также позволяет подвергать композицию поверхностному напряжению сдвига, не вызывая денатурации активного терапевтического белка или антитела. Подходящие неионные поверхностно-активные вещества включают полисорбаты (20, 40, 60, 65, 80 и т.д.), полиоксамеры (184, 188 и т.д.), полиолы PLURONIC®, TRITON®, моноэфиры полиоксиэтиленсорбитана (TWEEN®-20, TWEEN®-80 и др.), лауромакрогол-400, полиоксил 40 стеарат, полиоксиэтилен гидрогенизированного касторового масла 10, 50 и 60, моностеарат глицерина, сложный эфир сахарозы и жирной кислоты, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу. Анионные детергенты, которые можно использовать, включают лаурилсульфат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия и диоктилсульфонат натрия. Катионные детергенты включают хлорид бензалкония или хлорид бензетония.

В некоторых вариантах осуществления состав дополнительно содержит полисорбат-80. В некоторых вариантах осуществления состав дополнительно содержит полисорбат-80 в концентрации (масс./об.), выбранной из от около 0,0225% до около 0,0275%, от около 0,0225% до около 0,0270%, от около 0,0225% до около 0,0265%, от около 0,0225% до около 0,0260%, от около 0,0225% до около 0,0250% или из любой из около 0,0225%, 0,0230%, 0,0235%, 0,0240%, 0,0245%, 0,0250%, 0,0255%, 0,0260%, 0,0265%, 0,0270% или 0,0275%.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации от около 135 мг/мл до около 165 мг/мл (например, около 150 мг/мл), от около 10 мМ до около 25 мМ L-гистидина или гидрохлорида L-гистидина (например, около 15 мМ), трегалозу (например, дигидрат трегалозы) в концентрации от около 4% до около 10% и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) от около 0,0225% до около 0,0275% (например, около 0,025%), где рН жидкого состава составляет от 5,0 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации от около 135 мг/мл до около 165 мг/мл (например, около 150 мг/мл), от около 10 мМ до около 25 мМ L-гистидина или гидрохлорида L-гистидина (например, около 15 мМ), трегалозу (например, дигидрат трегалозы) в концентрации от около 150 мМ

до около 200 мМ (например, около 175 мМ) и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) от около 0,0225% до около 0,0275% (например, около 0,025%), где рН жидкого состава составляет от 5,0 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации от около 135 мг/мл до около 165 мг/мл (например, около 150 мг/мл), от около 10 мМ до около 25 мМ ацетата натрия (например, около 15 мМ), трегалозу (например, дигидрат трегалозы) в концентрации от около 4% до около 10% и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) от около 0,0225% до около 0,0275% (например, около 0,025%), где рН жидкого состава составляет от 5,0 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации от около 135 мг/мл до около 165 мг/мл (например, около 150 мг/мл), от около 10 мМ до около 25 мМ ацетата натрия (например, около 15 мМ), трегалозу (например, дигидрат трегалозы) в концентрации от около 150 мМ до около 200 мМ (например, около 175 мМ) и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) от около 0,0225% до около 0,0275% (например, около 0,025%), при этом рН жидкого состава составляет от 5,0 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации от около 135 мг/мл до около 165 мг/мл (например, около 150 мг/мл), от около 10 мМ до около 25 мМ L-гистидина или гидрохлорида L-гистидина (например, около 15 мМ), сахарозу в концентрации от около 4% до около 10% и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) от около 0,0225% до около 0,0275% (например, около 0,025%), при этом рН жидкого состава составляет от 5,0 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации от около 135 мг/мл до около 165 мг/мл (например, около 150 мг/мл), от около 10 мМ до около 25 мМ ацетата натрия (например, около 15 мМ), сахарозу в концентрации от около 4% до около 10% и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) от около 0,0225% до около 0,0275% (например, около 0,025%), где рН жидкого состава составляет от 5,0 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации от около 135 мг/мл до около 165 мг/мл (например, около 150 мг/мл), от около 10 мМ до около 25 мМ L-гистидина или гидрохлорида L-гистидина (например, около 15 мМ), сахарозу в концентрации от около 4% до около 10% и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) от около 0,0225% до около 0,0275% (например, около 0,025%), где рН жидкого состава составляет 6,0.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации от около 135 мг/мл до около 165 мг/мл (например, около 150 мг/мл), от около 10 мМ до около 25 мМ L-гистидина или гидрохлорида L-гистидина (например, около 15 мМ), трегалозу (например, дигидрат трегалозы) в концентрации от около 150 мМ до около 200 мМ (например, около 175 мМ) и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) от около 0,0225% до около 0,0275% (например, около 0,025%), где рН жидкого состава

составляет 6,0.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации от около 135 мг/мл до около 165 мг/мл (например, около 150 мг/мл), от около 10 мМ до около 25 мМ ацетата натрия (например, около 15 мМ), трегалозу (например, дигидрат трегалозы) в концентрации от около 150 мМ до около 200 мМ (например, около 175 мМ) и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) от около 0,0225% до около 0,0275% (например, около 0,025%), при этом рН жидкого состава составляет 6,0.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации от около 135 мг/мл до около 165 мг/мл (например, около 150 мг/мл), от около 10 мМ до около 25 мМ ацетата натрия (например, около 15 мМ), сахарозу в концентрации от около 4% до около 10% и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) от около 0,0225% до около 0,0275% (например, около 0,025%), где рН жидкого состава составляет 5,5.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации от около 135 мг/мл до около 165 мг/мл (например, около 150 мг/мл), от около 10 мМ до около 25 мМ ацетата натрия (например, около 15 мМ), сахарозу в концентрации от около 4% до около 10% и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) от около 0,0225% до около 0,0275% (например, около 0,025%), где рН жидкого состава составляет от 5,0 до 6,3.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации около 150 мг/мл, около 15 мМ L-гистидина или гидрохлорида L-гистидина, трегалозу (например, дигидрат трегалозы) в концентрации около 175 мМ и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) около 0,025%, при этом рН жидкого состава составляет 6,0.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации около 150 мг/мл, около 15 мМ ацетата натрия, трегалозу (например, дигидрат трегалозы) в концентрации около 175 мМ и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) около 0,025%, при этом рН жидкого состава составляет 5,5.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации около 150 мг/мл, около 15 мМ L-гистидина или гидрохлорида L-гистидина, сахарозу в концентрации около 5% и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) около 0,025%, при этом рН жидкого состава составляет 6,0.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации около 150 мг/мл, около 15 мМ ацетата натрия, сахарозу в концентрации около 5% и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) около 0,025%, при этом рН жидкого состава составляет 5,2. В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации около 150 мг/мл, около 15 мМ ацетата натрия, сахарозу в концентрации около 7,5% и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) около 0,025%, при этом рН жидкого состава составляет 5,2.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации около 150 мг/мл, около 15 мМ ацетата натрия, трегалозу (например,

дигидрат трегалозы) в концентрации около 5% и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) около 0,025%, при этом рН жидкого состава составляет 5,2.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации около 150 мг/мл, около 15 мМ ацетата натрия, трегалозу (например, дигидрат трегалозы) в концентрации около 7,5% и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) около 0,025%, при этом рН жидкого состава составляет 5,2.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации около 150 мг/мл, около 15 мМ ацетата натрия, сахарозу в концентрации около 5% и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) около 0,025%, при этом рН жидкого состава составляет 5,8.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации около 150 мг/мл, около 15 мМ ацетата натрия, сахарозу в концентрации около 7,5% и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) около 0,025%, при этом рН жидкого состава составляет 5,8.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации около 150 мг/мл, около 15 мМ ацетата натрия, трегалозу (например, дигидрат трегалозы) в концентрации около 5% и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) около 0,025%, при этом рН жидкого состава составляет 5,8.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит антитело к Siglec-8 в концентрации около 150 мг/мл, около 15 мМ ацетата натрия, трегалозу (например, дигидрат трегалозы) в концентрации около 7,5% и полисорбат-80 в концентрации (масс./об.) около 0,025%, при этом рН жидкого состава составляет 5,8.

Для того чтобы составы можно было использовать для введения *in vivo*, они должны быть стерильными. Композицию можно сделать стерильной путем фильтрации через стерильные мембраны для фильтрации. Терапевтические композиции по данному документу, как правило, помещают в контейнер, имеющий стерильный порт доступа, например, пакет с раствором для внутривенного введения или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

Путь введения соответствует известным и общепринятым способам, таким как однократный или многократный болюс или инфузия в течение длительного периода времени подходящим образом, например, путем подкожной инъекции.

Состав, описанный в данном документе, также может содержать более одного активного соединения, требуемого при конкретном показании подлежащем лечению, предпочтительно с дополняющими видами активности, которые не оказывают негативного влияния друг на друга. Такие активные соединения, как правило, присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для предполагаемого применения.

Составы по настоящему изобретению могут быть использованы для введения различных доз антитела индивиду. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивиду в количестве от 0,1 мг/кг до 10

мг/кг в одной или более дозах. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивиду в количестве от 1 мг/кг до 10 мг/кг в одной или более дозах. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивиду в количестве от 0,1 мг/кг до 3 мг/кг в одной или более дозах. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивиду в количестве от 0,1 мг/кг до 1 мг/кг в одной или более дозах. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивиду в количестве от около 1 мг/кг до около 3 мг/кг в одной или более дозах. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивиду в количестве 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг или 5 мг/кг в одной или более дозах. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивиду в количестве 300 мг в одной или более дозах. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивиду в количестве, выбранном из любого из около: 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,5 мг/кг, 4,0 мг/кг, 4,5 мг/кг, 5,0 мг/кг, 5,5 мг/кг, 6,0 мг/кг, 6,5 мг/кг, 7,0 мг/кг, 7,5 мг/кг, 8,0 мг/кг, 8,5 мг/кг, 9,0 мг/кг, 9,5 мг/кг или 10,0 мг/кг, в одной или более дозах.

Описанные в данном документе антитела, которые связываются с Siglec-8 человека, можно использовать либо отдельно, либо в комбинации с другими агентами в описанных в данном документе способах. Такая комбинированная терапия, упомянутая выше, включает комбинированное введение (при этом два или более терапевтических агента включены в один и тот же или отдельные составы) и раздельное введение, и в этом случае введение антитела по настоящему изобретению может происходить до, одновременно и/или после введения одного или более дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления введение антитела к Siglec-8, описанного в данном документе, и введение одного или более дополнительных терапевтических агентов происходит в течение около одного месяца, около двух месяцев, около трех месяцев, около четырех месяцев, около пяти месяцев или около шести месяцев. В некоторых вариантах осуществления введение антитела к Siglec-8, описанного в данном документе, и введение одного или более дополнительных терапевтических агентов происходят в течение около одной недели, около двух недель или около трех недель. В некоторых вариантах осуществления введение антитела к Siglec-8, описанного в данном документе, и введение одного или более дополнительных терапевтических агентов происходит в течение около одного дня, около двух дней, около трех дней, около четырех дней, около пяти дней или около шести дней.

Составы по настоящему изобретению можно вводить для лечения или профилактики различных патологий, например, для лечения заболеваний или нарушений, связанных с эозинофилами и/или тучными клетками. В некоторых вариантах осуществления у индивида, которого лечат составом по настоящему изобретению, имеется или было диагностировано заболевание или нарушение, характеризующееся

одним или более из: увеличения количества активированных эозинофилов, повышения активности тучных клеток, экспрессирующих Siglec-8, увеличения количества эозинофилов и/или тучных клеток или повышения активации эозинофилов и/или тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления у индивида, подлежащего лечению составом по настоящему изобретению, есть или было диагностировано одно или более заболеваний или нарушений, выбранных из группы, состоящей из: хронического риносинусита с сопутствующей астмой, аспириноподобно-индуцированного респираторного заболевания, неатопической астмы с дебютом во взрослом возрасте с заболеванием синусов, хронической обструктивной болезни легких, фиброзной болезни, предфиброзной болезни, распространенного системного мастоцитоза, вялотекущего системного мастоцитоза (ISM), воспалительного заболевания кишечника (IBD), эозинофильного эзофагита (EoE), эозинофильного гастрита (EG), эозинофильного гастроэнтерита (EGE), эозинофильного колита (EOC), эозинофильного дуоденита, тучноклеточного гастрита или тучноклеточного гастроэнтерита, гастрита или гастроэнтерита с повышенным содержанием тучных клеток, синдрома раздраженного кишечника, синдрома раздраженного кишечника с повышенным содержанием тучных клеток, функционального заболевания желудочно-кишечного тракта, функциональной диспепсии, аллергического конъюнктивита, гигантоклеточного папиллярного конъюнктивита, хронической крапивницы, аллергического бронхолегочного аспергиллеза (ABPA), аллергической астмы, астмы с эозинофильным или тучноклеточным фенотипом, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом (EGPA), целиакии, гастропареза, гиперэозинофильного синдрома, атопического дерматита, анафилаксии, ангионевротического отека, синдрома/нарушения активации тучных клеток и эозинофильного фасциита. В некоторых вариантах осуществления индивид, которого лечат составом по настоящему изобретению, представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления перед введением композиции индивид не прошел предшествующее лечение (например, стандартное лечение) по одной или более патологиям, описанным выше. В некоторых вариантах осуществления перед введением композиции у индивида были симптомы заболевания, которые не поддаются адекватному контролю с помощью предшествующего лечения (например, стандартного лечения) по одной или более патологиям, описанным выше.

В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в данном документе, введение приводит к снижению количества эозинофилов по сравнению с количеством эозинофилов до введения композиции, например, в биоптате, полученном от индивида, (для определения количества тканевых эозинофилов), или периферической крови (для определения количества эозинофилов в крови). В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в данном документе, введение приводит к снижению активации тучных клеток по сравнению с активацией тучных клеток до введения композиции, например, в биоптате, полученном из ткани или периферической крови. В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любым из вариантов

осуществления, описанных в данном документе, введение приводит к уменьшению одного или более симптомов у индивида по сравнению с одним или более симптомами у индивида до введения композиции. В некоторых вариантах осуществления введение (например, подкожная инъекция) приводит к снижению количества эозинофилов, сравнимому с внутривенной инфузией, например, в биоптате, полученном от индивида, (для определения количества эозинофилов в тканях) или периферической крови (для определения количества эозинофилов в крови). В некоторых вариантах осуществления введение (например, подкожная инъекция) количество эозинофилов в крови составляет менее 10^3 /мл или не обнаруживаются через 1 час, 3 часа, 15 дней, 35 дней, 56 дней и/или 85 дней после введения.

Антитела

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к выделенным антителам, которые связываются с Siglec-8 человека (например, агонистическое антитело, которое связывается с Siglec-8 человека). В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, описанное в данном документе, обладает одной или более из следующих характеристик: (1) связывает Siglec-8 человека; (2) связывается с внеклеточным доменом Siglec-8 человека; (3) связывает Siglec-8 человека с более высокой аффинностью, чем мышинное антитело 2E2 и/или мышинное антитело 2C4; (4) связывает Siglec-8 человека с более высокой avidностью, чем мышинное антитело 2E2 и/или мышинное антитело 2C4; (5) имеет T_m около 70°C - 72°C или выше в анализе теплового сдвига; (6) имеет пониженную степень фукозилирования или не фукозилировано; (7) связывает Siglec-8 человека, экспрессированный на эозинофилах, и индуцирует апоптоз эозинофилов; (8) связывает человеческий Siglec-8, экспрессированный на тучных клетках, и истощает или уменьшает количество тучных клеток; (9) связывает Siglec-8 человека, экспрессируемый на тучных клетках, и ингибирует FcεRI-зависимую активность тучных клеток (например, высвобождение гистамина, высвобождение PGD_2 , поток Ca^{2+} и/или высвобождение β-гексозаминидазы и т. д.); (10) был разработан для улучшения активности АЗКЦ; (11) связывает Siglec-8 человека, экспрессированный на тучных клетках, и убивает тучные клетки за счет активности АЗКЦ (in vitro, и/или in vivo); (12) связывается с Siglec-8 человека и отличного от человека примата; (13) связывается с доменом 1, доменом 2 и/или доменом 3 Siglec-8 человека или связывает полипептид Siglec-8, содержащий домен 1, домен 2 и/или домен 3 Siglec-8 человека, (например, описанные в данном документе слитые белки); и (14) истощает активированные эозинофилы с EC_{50} меньше, чем EC_{50} мышинных антител 2E2 или 2C4. Любое из антител, описанных в патенте США № 9546215 и/или WO 2015089117 могут найти применение в способах, композициях и наборах, представленных в данном документе.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления Siglec-8 человека включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72. В некоторых вариантах осуществления Siglec-8 человека включает аминокислотную последовательность SEQ ID

NO:73. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на тучных клетках, и истощает или уменьшает количество тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на тучных клетках, и ингибирует опосредованную тучными клетками активность.

В одном аспекте изобретение относится к антителам, которые связываются с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления Siglec-8 человека включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72. В некоторых вариантах осуществления Siglec-8 человека включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с эпитопом в домене 1 Siglec-8 человека, причем домен 1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с эпитопом в домене 2 Siglec-8 человека, причем домен 2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с эпитопом в домене 3 Siglec-8 человека, причем домен 3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается со слитым белком, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116, но не со слитым белком, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается со слитым белком, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:117, но не со слитым белком, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается со слитым белком, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:117, но не со слитым белком, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с линейным эпитопом во внеклеточном домене Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с конформационным эпитопом внеклеточного домена Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на эозинофилах, и индуцирует апоптоз эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на тучных клетках, и истощает тучные клетки. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на тучных клетках, и ингибирует опосредованную тучными клетками активность. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на тучных клетках, и уничтожает тучные клетки за посредством

активности АЗКЦ. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, истощает тучные клетки и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, истощает количество активированных эозинофилов и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, (например, нефукозилированное антитело к Siglec-8) истощает эозинофилы крови и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, (например, нефукозилированное антитело к Siglec-8) истощает количество эозинофилов в периферической крови и ингибирует активацию тучных клеток.

В данном документе предложено выделенное антитело к Siglec-8, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 отличного от человека примата. Идентификация антител с перекрестной реактивностью у приматов может быть полезной для доклинического исследования антител к Siglec-8 у отличных от человека приматов. В одном аспекте изобретение относится к антителам, которые связываются с Siglec-8 отличного от человека примата. В другом аспекте изобретение относится к антителам, которые связываются с Siglec-8 человека и Siglec-8 отличного от человека примата. В некоторых вариантах осуществления Siglec-8 отличного от человека примата включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:118 или ее часть. В некоторых вариантах осуществления Siglec-8 отличного от человека примата включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:119 или ее часть. В некоторых вариантах осуществления отличный от человека примат представляет собой павиана (например, *Papio Anubis*). В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 отличного от человека примата, связывается с эпитопом в домене 1 Siglec-8 человека. В дополнительном варианте осуществления домен 1 Siglec-8 человека включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:112. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 отличного от человека примата, связывается с эпитопом в домене 3 Siglec-8 человека. В дополнительном варианте осуществления домен 3 Siglec-8 человека включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:114. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 отличного от человека примата, представляет собой гуманизированное антитело, химерное антитело или антитело человека. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 отличного от человека примата, представляет собой мышинное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 отличного от человека примата, представляет собой антитело IgG1 человека.

В одном аспекте антитело к Siglec-8, описанное в данном документе, представляет собой моноклональное антитело. В другом аспекте антитело к Siglec-8, описанное в данном документе, представляет собой фрагмент антитела (включая антигенсвязывающий

фрагмент), например, фрагмент Fab, Fab'-SH, Fv, scFv или (Fab')₂. В одном аспекте антитело к Siglec-8, описанное в данном документе, включает фрагмент антитела (включая антигенсвязывающий фрагмент), например, фрагмент Fab, Fab'-SH, Fv, scFv или (Fab')₂. В другом аспекте антитело к Siglec-8, описанное в данном документе, представляет собой химерное, гуманизированное или человеческое антитело. В одном аспекте любое из описанных в данном документе антител к Siglec-8 является очищенным.

В одном аспекте предложены антитела к Siglec-8, которые конкурируют с мышинным антителом 2E2 и мышинным антителом 2C4, связывающимся с Siglec-8. Также предложены антитела к Siglec-8, которые связываются с тем же эпитопом, что и мышинное антитело 2E2 и мышинное антитело 2C4. Мышиные антитела к Siglec-8, антитела 2E2 и 2C4 описаны в патенте США № 8207305, патенте США № 8197811, патенте США № 7871612, и в патенте США № 7557191.

В одном аспекте предложены антитела к Siglec-8, которые конкурируют с любым антителом к Siglec-8, описанным в данном документе, (например, НЕКА, НЕКФ, 1С3, 1Н10, 4F11, 2С4, 2Е2) за связывание с Siglec-8. Также предложены антитела к Siglec-8, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое антитело к Siglec-8, описанное в данном документе, (например, НЕКА, НЕКФ, 1С3, 1Н10, 4F11, 2С4, 2Е2).

В одном аспекте настоящего изобретения предложены полинуклеотиды, кодирующие антитела к Siglec-8. В определенных вариантах осуществления предложены векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие антитела к Siglec-8. В определенных вариантах осуществления предложены клетки-хозяева, содержащие такие векторы. В еще одном аспекте настоящего изобретения предложены композиции, содержащие антитела к Siglec-8 или полинуклеотиды, кодирующие антитела к Siglec-8. В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению представляет собой фармацевтический состав для лечения заболевания или нарушения, связанного с эозинофилами или тучными клетками, по настоящему изобретению.

В одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее 1, 2, 3, 4, 5 или 6 последовательностей HVR мышинового антитела 2C4. В другом аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее 1, 2, 3, 4, 5 или 6 последовательностей HVR мышинового антитела 2E2. В некоторых вариантах осуществления HVR представляет собой CDR по Kabat или CDR по Chothia.

В одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее 1, 2, 3, 4, 5 или 6 последовательностей HVR мышинового антитела 1C3. В другом аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее 1, 2, 3, 4, 5 или 6 последовательностей HVR мышинового антитела 4F11. В другом аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее 1, 2, 3, 4, 5 или 6 последовательностей HVR мышинового антитела 1H10. В некоторых вариантах осуществления HVR представляет собой CDR по Kabat или CDR по Chothia.

В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с эпитопом в домене 1 Siglec-8 человека, причем домен 1 содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с эпитопом в домене 2 Siglec-8 человека, причем домен 2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с эпитопом в домене 3 Siglec-8 человека, причем домен 3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114.

В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается со слитым белком, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116, но не со слитым белком, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается со слитым белком, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:117, но не со слитым белком, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:115. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается со слитым белком, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:117, но не со слитым белком, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO:116.

В еще одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, (ii) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, и (iii) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:94; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, (ii) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:100, и (iii) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:103. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с эпитопом в домене 2 Siglec-8 человека, причем домен 2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113.

В еще одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, (ii) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:92, и (iii) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:95; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98, (ii) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:101, и (iii) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:104. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с эпитопом в домене 3 Siglec-8 человека, причем домен 3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах

осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 отличного от человека примата.

В еще одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, (ii) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:93, и (iii) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:96; и/или переменную область легкой цепи, содержащую (i) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99, (ii) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:102, и (iii) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с эпитопом в домене 1 Siglec-8 человека, причем домен 1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в данном документе, связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 отличного от человека примата.

В одном аспекте в настоящем документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62, и (iii) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63; и/или при этом переменная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64, (ii) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65, и (iii) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66.

В одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:67-70; и/или при этом переменная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64, (ii) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65, и (iii) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66.

В одном аспекте в настоящем документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2, включающую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62, и (iii) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63; и/или при этом переменная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64, (ii) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65, и (iii) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71.

В еще одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, при этом переменная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62, и (iii) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:67-70; и/или при этом переменная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64, (ii) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65, и (iii) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71.

В еще одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, (ii) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, и (iii) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:94; и/или переменную область легкой цепи, содержащую (i) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, (ii) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:100, и (iii) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:103.

В еще одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, (ii) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:92, и (iii) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:95; и/или переменную область легкой цепи, содержащую (i) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98, (ii) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:101, и (iii) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:104.

В еще одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, (ii) HVR-H2, включающую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:93, и (iii) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:96; и/или переменную область легкой цепи, содержащую (i) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99, (ii) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:102, и (iii) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105.

Антитело к Siglec-8, описанное в данном документе, может содержать любую подходящую последовательность каркасного переменного домена при условии, что антитело сохраняет способность связывать Siglec-8 человека. В контексте данного документа каркасные области тяжелой цепи обозначены как «HC-FR1-FR4», а каркасные области легкой цепи обозначены как «LC-FR1-FR4». В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 содержит каркасную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 26, 34, 38 и 45 (HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3 и HC-FR4, соответственно). В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 содержит каркасную последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 48, 51, 55 и 60 (LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3 и LC-FR4, соответственно). В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 содержит каркасную последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 48, 51, 58 и 60 (LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3 и LC-FR4, соответственно).

В одном варианте осуществления антитело к Siglec-8 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий каркасную последовательность и гиперпеременные области, при этом каркасная последовательность содержит последовательности HC-FR1-HC-FR4 SEQ ID NO:26-29 (HC-FR1), SEQ ID NO: 31-36 (HC-FR2), SEQ ID NO: 38-43 (HC-FR3) и SEQ ID NO: 45 или 46 (HC-FR4), соответственно; HVR-H1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61; HVR-H2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62; и HVR-H3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63. В одном варианте осуществления антитело к Siglec-8 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий каркасную последовательность и гиперпеременные области, при этом каркасная последовательность содержит последовательности HC-FR1-HC-FR4 SEQ ID NO:26-29 (HC-FR1), SEQ ID NO: 31-36 (HC-FR2), SEQ ID NO: 38-43 (HC-FR3) и SEQ ID NO: 45 или 46 (HC-FR4), соответственно; HVR-H1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61; HVR-H2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62; и HVR-H3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:67-70. В одном варианте осуществления антитело к Siglec-8 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий каркасную последовательность и гиперпеременные области, при этом каркасная последовательность содержит последовательности LC-FR1-LC-FR4 SEQ ID NO: 48 или 49 (LC-FR1), SEQ ID NO: 51-53 (LC-FR2), SEQ ID NO: 55-58 (LC-FR3) и SEQ ID NO: 60 (LC-FR4) соответственно; HVR-L1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64; HVR-L2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65; и

HVR-L3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66. В одном варианте осуществления антитело к Siglec-8 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий каркасную последовательность и гиперпеременные области, при этом каркасная последовательность содержит последовательности LC-FR1-LC-FR4 SEQ ID NO: 48 или 49 (LC-FR1), SEQ ID NO: 51-53 (LC-FR2), SEQ ID NO: 55-58 (LC-FR3) и SEQ ID NO: 60 (LC-FR4) соответственно; HVR-L1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64; HVR-L2 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65; и HVR-L3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:71. В одном варианте осуществления этих антител переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:2-10, а переменный домен легкой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:16-22. В одном варианте осуществления этих антител переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:2-10, а переменный домен легкой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:23 или 24. В одном варианте осуществления этих антител переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:11-14, а переменный домен легкой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:16-22. В одном варианте осуществления этих антител переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:11-14, а переменный домен легкой цепи включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:23 или 24. В одном варианте осуществления этих антител переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, а переменный домен легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16. В одном варианте осуществления этих антител переменный домен тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, а переменный домен легкой цепи включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.

В некоторых вариантах осуществления последовательности HVR тяжелой цепи включают следующее:

- a) HVR-H1 (IYGAH (SEQ ID NO:61));
- b) HVR-H2 (VIWAGGSTNYNSALMS (SEQ ID NO:62)); и
- c) HVR-H3 (DGSSPYYSMEY (SEQ ID NO:63); DGSSPYYYGMEY (SEQ ID NO:67); DGSSPYYSMDY (SEQ ID NO:68); DGSSPYYSMEV (SEQ ID NO:69); или DGSSPYYYGMDV (SEQ ID NO:70)).

В некоторых вариантах осуществления последовательности HVR тяжелой цепи включают следующее:

- a) HVR-H1 (SYAMS (SEQ ID NO:88); DYYMY (SEQ ID NO:89); или SSWMN (SEQ ID NO:90));
- b) HVR-H2 (IISGGSYTYSDSVKG (SEQ ID NO:91); RIAPEDGDTEYAPKFQG (SEQ ID NO:92); или QIYPGDDYTNNGKFKG (SEQ ID NO:93)); и c) HVR-H3

(HETAQAAWFAY (SEQ ID NO:94); EGNYYGSSILDY (SEQ ID NO:95); или LGPYGPFAD (SEQ ID NO:96)).

В некоторых вариантах осуществления последовательности FR тяжелой цепи включают следующее:

a) HC-FR1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT (SEQ ID NO:26); EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLT (SEQ ID NO:27); QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS (SEQ ID NO:28); или QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLT (SEQ ID NO:29));

b) HC-FR2 (WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO:31); WVRQAPGKGLEWLG (SEQ ID NO:32); WVRQAPGKGLEWLS (SEQ ID NO: 33); WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO:34); WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO:35); или WVRQPPGKGLEWLG (SEQ ID NO:36));

c) HC-FR3 (RFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:38); RLSISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:39); RLTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:40); RFSISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:41); RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO:42); или RLSISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:43)); и

d) HC-FR4 (WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45); или WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:46)).

В некоторых вариантах осуществления последовательности HVR легкой цепи включают следующее:

a) HVR-L1 (SATSSVSYMH (SEQ ID NO:64));

b) HVR-L2 (STSNLAS (SEQ ID NO:65)); и

c) HVR-L3 (QQRSSYPFT (SEQ ID NO:66); или QQRSSYPYT (SEQ ID NO:71)).

В некоторых вариантах осуществления последовательности HVR легкой цепи включают следующее:

a) HVR-L1 (SASSSVSYMH (SEQ ID NO:97); RASQDITNYLN (SEQ ID NO:98); или SASSSVSYMY (SEQ ID NO:99));

b) HVR-L2 (DTSKLAY (SEQ ID NO:100); FTSRLHS (SEQ ID NO:101); или DTSSLAS (SEQ ID NO:102)); и

c) HVR-L3 (QQWSSNPPT (SEQ ID NO:103); QQGNTLPWT (SEQ ID NO:104); или QQWNSDPYT (SEQ ID NO:105)).

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (i) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:88, (ii) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:91, и (iii) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:94; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:97, (ii) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID

NO:100, и (iii) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:103;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (i) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:89, (ii) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:92, и (iii) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:95; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:98, (ii) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:101, и (iii) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:104; или

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (i) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:90, (ii) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:93, и (iii) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:96; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:99, (ii) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:102, и (iii) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:105.

В некоторых вариантах осуществления последовательности FR легкой цепи включают следующее:

a) LC-FR1 (EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:48); или EIIITQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO:49));

b) LC-FR2 (WFQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO:51); WFQQKPGQAPRLWIY (SEQ ID NO:52); или WYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO: 53));

c) LC-FR3 (GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:55); GVPARFSGSGSGTDYTLTSSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:56); GVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:57); или GIPARFSGSGSGTDYTLTSSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:58)); и

d) LC-FR4 (FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)).

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено антитело к Siglec-8 (например, гуманизованное антитело к Siglec-8), которое связывается с Siglec-8 человека, причем антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, при этом антитело содержит:

(а) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:

(1) HC-FR1, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:26-29;

(2) HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;

(3) HC-FR2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:31-36;

(4) HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62;

(5) HC-FR3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:38-43;

(6) HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63; и

(7) HC-FR4, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:45-46,

и/или

(b) вариабельный домен легкой цепи, содержащий:

(1) LC-FR1, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:48-49;

(2) HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64;

(3) LC-FR2, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:51-53;

(4) HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65;

(5) LC-FR3, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:55-58;

(6) HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66; и

(7) LC-FR4, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

В одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO:2-10, и/или содержащее вариабельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO:16-22. В одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO:2-14, и/или содержащее вариабельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO:16-24. В одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO:2-10, и/или содержащее вариабельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO:23 или 24. В одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO:11-14, и/или содержащее вариабельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO:16-22. В одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO:11-14, и/или содержащее вариабельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO:23 или 24. В одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 6 и/или содержащее вариабельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 16 или 21.

В одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO:106-108, и/или содержащее вариабельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO:109-111. В одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:106 и/или содержащее вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO:109. В одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8,

содержащее переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:107 и/или содержащее переменный домен легкой цепи SEQ ID NO:110. В одном аспекте в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:108 и/или содержащее переменный домен легкой цепи SEQ ID NO:111.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2-14. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 106-108. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, содержит замены, вставки или делеции. относительно эталонной последовательности, но антитело, содержащее эту аминокислотную последовательность, сохраняет способность связываться с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) происходят в областях за пределами HVR (т.е. в FR). В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 содержит переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 содержит переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:106-108.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO:16-24. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO:109-111. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, содержит замены, вставки или делеции. относительно эталонной последовательности, но антитело, содержащее эту аминокислотную последовательность, сохраняет способность связываться с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) происходят в областях за пределами HVR (т.е. в FR). В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 содержит

вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16 или 21. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 содержит вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:109-111.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложено антитело к Siglec-8, содержащее (а) один, две или три HVR VH, выбранные из представленных в таблице 1, и/или (б) один, две или три HVR VL, выбранные из приведенных в таблице 1.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложено антитело к Siglec-8, содержащее (а) один, две или три HVR VH, выбранные из представленных в таблице 2, и/или (б) один, две или три HVR VL, выбранные из приведенных в таблице 2.

В одном аспекте в настоящем изобретении предложено антитело к Siglec-8, содержащее (а) одну, две, три или четыре FR VH, выбранные из приведенных в таблице 3, и/или (б) одну, две, три или четыре FR VL, выбранные из приведенных в таблице 3.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи и/или вариабельный домен легкой цепи антитела, приведенного в таблице 4, например, антитела НАКА, антитела НАКВ, антитела НАКС и т. д.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности HVR антител

Цепь антитела	HVR1	HVR2	HVR3
<i>Антитело 2E2</i>			
Тяжелая цепь	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYSM EY SEQ ID NO:63
Легкая цепь	SATSSVSYMH SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPFT SEQ ID NO:66
<i>Гуманизированные варианты тяжелой цепи 2E2 RHA, 2E2 RHB, 2E2 RHC, 2E2 RHD, 2E2 RHE, 2E2 RHF, 2E2 RHG, 2E2 RHA2, и 2E2 RHB2</i>			
Тяжелая цепь	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYSM EY SEQ ID NO:63
<i>Гуманизированные варианты легкой цепи 2E2 RKA, 2E2 RKB, 2E2 RKC, 2E2 RKD, 2E2 RKE, 2E2 RKF, и 2E2 RKG</i>			
Легкая цепь	SATSSVSYMH SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPFT SEQ ID NO:66
<i>Гуманизированные варианты тяжелой цепи 2E2 RHE S-G, 2E2 RHE E-D, 2E2 RHE Y-V, и 2E2 RHE с тройной мутацией</i>			
2E2 RHE S-G	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYGMEY SEQ ID NO:67
2E2 RHE E-D	IYGAH	VIWAGGSTNYNSALMS	DGSSPYYYSM DY

	SEQ ID NO:61	SEQ ID NO:62	SEQ ID NO:68
2E2 RHE Y-V	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYSM EV SEQ ID NO:69
2E2 RHE triple	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYGMDV SEQ ID NO:70
<i>Гуманизированные варианты легкой цепи 2E2 RKA F-Y и 2E2 RKF F-Y</i>			
2E2 RKA F-Y	SATSSVSYMH SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPYT SEQ ID NO:71
2E2 RKF F-Y	SATSSVSYMH SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPYT SEQ ID NO:71

Таблица 2. Аминокислотные последовательности HVR из мышинных антител 1C3, 1H10 и 4F11

Антитело	Цепь	HVR1	HVR2	HVR3
1C3	Тяжелая цепь	SYAMS SEQ ID NO:88	IISGGSYTYYSDSVKG SEQ ID NO:91	HETAQAAWFAY SEQ ID NO:94
1H10	Тяжелая цепь	DYYMY SEQ ID NO:89	RIAPEDGDTEYAPKFQG SEQ ID NO:92	EGNYYGSSILDY SEQ ID NO:95
4F11	Тяжелая цепь	SSWMN SEQ ID NO:90	QIYPGDDYTNYNGKFKG SEQ ID NO:93	LGPYGPFFAD SEQ ID NO:96
1C3	Легкая цепь	SASSSVSYMH SEQ ID NO:97	DTSKLAY SEQ ID NO:100	QQWSSNPPT SEQ ID NO:103
1H10	Легкая цепь	RASQDITNYLN SEQ ID NO:98	FTSRLHS SEQ ID NO:101	QQGNTLPWT SEQ ID NO:104
4F11	Легкая цепь	SASSSVSYMY SEQ ID NO:99	DTSSLAS SEQ ID NO:102	QQWNSDPYT SEQ ID NO:105

Таблица 3. Аминокислотные последовательности FR антител

Тяжелая цепь	FR1	FR2	FR3	FR4
2E2	QVQLKESG PGL VAPSQSL SITCT VSGFSLT (SEQ ID NO:25)	WVRQPPGKGL EWLG (SEQ ID NO:30)	RLSISKDNSKSQ VFLKINSLQTD DTALYYCAR (SEQ ID NO:37)	WGQGTSVTVS S (SEQ ID NO:44)
2E2 RHA	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFSLT	WVRQAPGKGL EWVS (SEQ ID NO:31)	RFTISKDNSKNT VYLQMNSLRA EDTAVYYCAR	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)

	(SEQ ID NO:26)		(SEQ ID NO:38)	
2E2 RHB	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AVSGFSLT (SEQ ID NO:27)	WVRQAPGKGL EWLG (SEQ ID NO:32)	RLSISKDNSKNT VYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (SEQ ID NO:39)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHC	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AVSGFSLT (SEQ ID NO:27)	WVRQAPGKGL EWVS (SEQ ID NO:31)	RFTISKDNSKNT VYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHD	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWLS (SEQ ID NO:33)	RFTISKDNSKNT VYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKNT VYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHF	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVS (SEQ ID NO:31)	RLTISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:40)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHG	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVS (SEQ ID NO:31)	RFSISKDNSKNT VYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (SEQ ID NO:41)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHA2	QVQLQESGPGL VKPSETLSLTCT VSGGSIS (SEQ ID NO:28)	WIRQPPGKGLE WIG (SEQ ID NO:35)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYCAR (SEQ ID NO:42)	WGQGTTLVTVS S (SEQ ID NO:46)
2E2 RHB2	QVQLQESGPGL VKPSETLSLTCT VSGFSLT (SEQ ID NO:29)	WVRQPPGKGL EWLG (SEQ ID NO:36)	RLSISKDNSKN QVSLKLSSVTA ADTAVYYCAR (SEQ ID NO:43)	WGQGTTLVTVS S (SEQ ID NO:46)

2E2 RHE S-G	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKNT VYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE E-D	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKNT VYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE Y-V	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKNT VYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE triple	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKNT VYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
Легкая цепь	FR1	FR2	FR3	FR4
2E2	QIILTQSPAIMS ASPGEKVSITC (SEQ ID NO:47)	WFQQKPGTSPK LWIY (SEQ ID NO:50)	GVPVRFSGSGS GTSYSLTISRME AEDAATYYC (SEQ ID NO:54)	FGSGTKLEIK (SEQ ID NO:59)
RKA	EIVLTQSPATLS LSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSG TDFTLTISLEP EDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKB	EIILTQSPATLSL SPGERATLSC (SEQ ID NO:49)	WFQQKPGQAP RLWIY (SEQ ID NO:52)	GVPARFSGSGS GTDYTLTISLE PEDFAVYYC (SEQ ID NO:56)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKC	EIILTQSPATLSL SPGERATLSC (SEQ ID NO:49)	WFQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSG TDFTLTISLEP EDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)

RKD	EIVLTQSPATLS LSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAP RLWIY (SEQ ID NO:52)	GIPARFSGSGSG TDFTLTISSELP EDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKE	EIVLTQSPATLS LSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:51)	GVPARFSGSGS GTDFTLTISSELP PEDFAVYYC (SEQ ID NO:57)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKF	EIVLTQSPATLS LSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSG TDYTLTISSELP EDFAVYYC (SEQ ID NO:58)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKG	EIVLTQSPATLS LSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WYQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:53)	GIPARFSGSGSG TDFTLTISSELP EDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKA F-Y	EIVLTQSPATLS LSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSG TDFTLTISSELP EDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKF F-Y	EIVLTQSPATLS LSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSG TDYTLTISSELP EDFAVYYC (SEQ ID NO:58)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)

Таблица 4. Аминокислотные последовательности переменных областей антител

Название антитела	Переменный домен тяжелой цепи	Переменный домен легкой цепи
ch2C4	ch2C4 VH	ch2C4 VK
ch2E2	ch2E2 VH (SEQ ID NO:1)	ch2E2 VK (SEQ ID NO:15)
cVHKA	ch2E2 VH (SEQ ID NO:1)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
cVHKB	ch2E2 VH (SEQ ID NO:1)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)

HAcVK	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	ch2E2 VK (SEQ ID NO:15)
HBcVK	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	ch2E2 VK (SEQ ID NO:15)
HAKA	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HAKB	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HAKC	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HAKD	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HAKE	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HAKF	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HAKG	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HBKA	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HBKB	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HBKC	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HBKD	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HBKE	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HBKF	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HBKG	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HCKA	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HCKB	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HCKC	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HCKD	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HCKE	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)

HCKF	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HCKG	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HDKA	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HDKB	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HDKC	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HDKD	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HDKE	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HDKF	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HDKG	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HEKA	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HEKB	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HEKC	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HEKD	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HEKE	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HEKF	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HEKG	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HFKA	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HFKB	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HFKC	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HFKD	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HFKE	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)

HFKF	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HFKG	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HGKA	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HGKB	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HGKC	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HGKD	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HGKE	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HGKF	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HGHG	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HA2KA	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HA2KB	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HB2KA	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HB2KB	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HA2KF	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HB2KF	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HA2KC	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HA2KD	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HA2KE	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HA2KF	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HA2KG	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HB2KC	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)

HB2KD	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HB2KE	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HA2KFmut	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HB2KFmut	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HEKAmut	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKA F-Y mut (SEQ ID NO:23)
HEKFmut	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HAKFmut	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HBKFmut	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HCKFmut	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HDKFmut	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HFKFmut	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
HGKFmut	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
RHE Y-VKA	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
RHE Y-VKB	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
RHE Y-VKC	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
RHE Y-VKD	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
RHE Y-VKE	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
RHE Y-VKF	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
RHE Y-VKG	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
RHE E-DKA	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
RHE E-DKB	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)

RHE E-DKC	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
RHE E-DKD	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
RHE E-DKE	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
RHE E-DKF	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
RHE E-DKG	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
RHE E-DKFmut	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
RHE S-GKA	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
RHE S-GKB	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
RHE S-GKC	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
RHE S-GKD	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
RHE S-GKE	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
RHE S-GKF	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
RHE S-GKG	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
RHE Triple-KA	2E2 RHE triple (SEQ ID NO:14)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
RHE Triple-KB	2E2 RHE triple (SEQ ID NO:14)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
RHE Triple-KC	2E2 RHE triple (SEQ ID NO:14)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
RHE Triple-KD	2E2 RHE triple (SEQ ID NO:14)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
RHE Triple-KE	2E2 RHE triple (SEQ ID NO:14)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
RHE Triple-KF	2E2 RHE triple (SEQ ID NO:14)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
RHE Triple-KG	2E2 RHE triple (SEQ ID NO:14)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
RHE Triple-KFmut	2E2 RHE triple (SEQ ID NO:14)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)

RHE Y-VKFmut	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)
RHE E-DKFmut	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO:24)

Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, тяжелые цепи которых обозначаются α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Классы γ и α дополнительно делятся на подклассы, например, у людей экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Антитела IgG1 могут существовать в виде нескольких полиморфных вариантов, называемых аллотипами (обзор приведен в Jefferis and Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4 1-7), любой из которых подходит для применения в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения. Распространенные аллотипические варианты в человеческих популяциях обозначаются буквами a, f, n, z или их комбинациями. В любом из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело может содержать область Fc тяжелой цепи, включающую область Fc IgG человека. В дополнительных вариантах осуществления область Fc IgG человека включает IgG1 или IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG4. В некоторых вариантах осуществления IgG4 человека содержит аминокислотную замену S228P, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, как в Kabat. В некоторых вариантах осуществления IgG1 человека включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:78. В некоторых вариантах осуществления IgG4 человека включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO:79.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено антитело к Siglec-8, содержащее тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:75; и/или легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 76 или 77. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87; и/или легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 представляет собой лирентелимаб. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 индуцирует апоптоз активированных эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 индуцирует апоптоз покоящихся эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 истощает активированные эозинофилы и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 истощает или уменьшает количество тучных клеток и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 истощает или уменьшает количество тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 уничтожает тучные клетки посредством активности АЗКЦ. В некоторых вариантах осуществления антитело истощает или уменьшает количество тучных клеток,

экспрессирующих Siglec-8, в ткани. В некоторых вариантах осуществления антитело истощает или уменьшает количество тучных клеток, экспрессирующих Siglec-8, в биологической жидкости.

1. Аффинность антител

В некоторых аспектах антитело к Siglec-8, описанное в данном документе, связывается с Siglec-8 человека примерно с такой же или более высокой аффинностью и/или более высокой авидностью по сравнению с мышинным антителом 2E2 и/или мышинным антителом 2C4. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, предложенное в данном документе, имеет константу диссоциации (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 150 нМ, ≤ 100 нМ, ≤ 50 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или меньше, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М). В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, описанное в данном документе, связывается с Siglec-8 человека в около 1,5 раза, около 2 раза, около 3 раза, около 4 раза, около 5 раз, около 6 раз, около 7 раз, около 8 раз, около 9 раз или в около 10 раз большей аффинностью, чем мышинное антитело 2E2 и/или мышинное антитело 2C4. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6; и/или переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16 или 21.

В одном варианте осуществления аффинность связывания антитела к Siglec-8 можно определить с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса. Например, значение K_d или K_d можно измерить с помощью BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Пискатауэй, штат Нью-Джерси) при 25°C с чипами с иммобилизованным антигеном CM5 при ~10 единицах ответа (RU). Вкратце, биосенсорные чипы карбоксиметилированного декстрана (CM5, BIAcore® Inc.) активируют гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика. Захватывающие антитела (например, антитело к Fc человека) разбавляют 10 мМ ацетатом натрия, pH 4,8, перед инъекцией со скоростью потока 30 мкл/мин., а затем иммобилизуют с антителом к Siglec-8. Для кинетических измерений двукратные серийные разведения димерного Siglec-8 вводят в PBS с 0,05% Tween 20 (PBST) при 25°C со скоростью потока приблизительно 25 мкл/мин. Частота ассоциации (k_{on}) и скорость диссоциации (k_{off}) рассчитываются с использованием простой модели связывания Ленгмюра 1:1 (BIAcore® Evaluation Software, версия 3.2) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (K_d) рассчитывают как отношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881.

В еще одном варианте осуществления биослойная интерферометрия может быть использована для определения аффинности антител к Siglec-8 против Siglec-8. В типовом анализе меченный белок Siglec-8-Fc иммобилизуют на сенсорах для захвата с антителом к человеческому иммуноглобулину и инкубируют с увеличивающимися концентрациями

мышинных, химерных или гуманизированных фрагментов Fab к Siglec-8 для измерения аффинности с использованием такого прибора, как, например, система Octet Red 384 (ForteBio).

Аффинность связывания антитела к Siglec-8 можно, например, также определить с помощью анализа Скэтчарда, описанного Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980) с использованием стандартных методик, хорошо известных в соответствующей области техники. См. также Scatchard, G., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660 (1947).

2. Авидность антител

В некоторых вариантах осуществления авидность связывания антитела к Siglec-8 можно определить с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса. Например, значение K_d или K_d можно измерить с помощью VIAcore T100. Захватывающие антитела (например, козье антитело к Fc человека и козье антитело к Fc мыши) иммобилизуют на чипе CM5. На проточные ячейки могут быть иммобилизованы античеловеческие или антимышинные антитела. Анализ проводят при определенной температуре и скорости потока, например, при 25°C при скорости потока 30 мкл/мин. Димерный Siglec-8 разбавляют в буфере для анализа в различных концентрациях, например, в диапазоне концентраций от 15 нМ до 1,88 пМ. Антитела захватываются и проводятся высокоэффективные инъекции с последующей диссоциацией. Проточные ячейки регенерируют буфером, например, 50 мМ глицина, pH 1,5. Результаты анализов с использованием пустой эталонной ячейки и нескольких инъекций буфера для анализа анализируют с параметрами глобальной аппроксимации 1:1.

3. Конкурентные анализы

Конкурентные анализы можно использовать для определения того, связывают ли два антитела один и тот же эпитоп, распознавая идентичные или стерически перекрывающиеся эпитопы, или одно антитело конкурентно ингибирует связывание другого антитела с антигеном. Эти анализы известны в данной области техники. Как правило, антиген или клетки, экспрессирующие антиген, иммобилизуют на многолуночном планшете и измеряют способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител. Обычными метками для таких анализов конкуренции являются радиоактивные метки или ферментные метки. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, описанное в данном документе, конкурирует с антителом 2E2, описанным в данном документе, за связывание с эпитопом, присутствующим на поверхности клетки (например, тучной клетки). В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, описанное в данном документе, конкурирует с антителом, содержащим переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, в отношении связывания с эпитопом, присутствующим на поверхности клетки (например, тучной клетки). В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, описанное в данном документе, конкурирует с антителом 2C4, описанным в данном документе, за связывание

с эпитопом, присутствующим на поверхности клетки (например, тучной клетки). В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, описанное в данном документе, конкурирует с антителом, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 (как указано в патенте США № 8207305), и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4 (как указано в патенте США № 8207305), в отношении связывания с эпитопом, присутствующим на поверхности клетки (например, тучной клетки).

4. Термостабильность

В некоторых аспектах антитело к Siglec-8, описанное в данном документе, имеет температуру плавления (T_m) по меньшей мере около 70°C , по меньшей мере около 71°C или по меньшей мере около 72°C в анализе теплового сдвига. В иллюстративном анализе теплового сдвига образцы, содержащие гуманизированное антитело к Siglec-8, инкубируют с флуоресцентным красителем (Sypro Orange) в течение 71 цикла с увеличением на 1°C за цикл в термоциклере для количественной ПЦР для определения T_m . В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 имеет аналогичную или более высокую T_m по сравнению с мышинным антителом 2E2 и/или мышинным антителом 2C4. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 содержит вариабельную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6; и/или вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16 или 21. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 имеет такую же или более высокую T_m по сравнению с химерным антителом 2C4. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 имеет такую же или более высокую T_m по сравнению с антителом, имеющим тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:84, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:85.

5. Анализы биологической активности

В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, описанное в данном документе, истощает эозинофилы и ингибирует тучные клетки. Анализы для оценки апоптоза клеток хорошо известны в данной области техники, например, окрашивание аннексином V и анализ TUNNEL.

В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, описанное в данном документе, индуцирует активность АЗКЦ. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, описанное в данном документе, уничтожает эозинофилы, экспрессирующие Siglec-8, посредством активности АЗКЦ. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит нефукозилированные (т.е. афукозилированные) антитела к Siglec-8. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая нефукозилированные антитела к Siglec-8, описанные в данном документе, повышает активность АЗКЦ против эозинофилов, экспрессирующих Siglec-8, по сравнению с композицией, содержащей частично фукозилированные антитела к Siglec-8. Анализы для

оценки активности АЗКЦ хорошо известны в данной области техники и описаны в данном документе. В иллюстративном анализе для измерения активности АЗКЦ используют эффекторные клетки и клетки-мишени. Примеры эффекторных клеток включают натуральные клетки-киллеры (NK), большие гранулярные лимфоциты (LGL), лимфокин-активированные клетки-киллеры (LAK) и РВМС, включающие NK и LGL, или лейкоциты, имеющие Fc-рецепторы на клеточной поверхности, такие как нейтрофилы, эозинофилы и макрофаги. Эффекторные клетки могут быть выделены из любого источника, включая индивидов с представляющим интерес заболеванием. Клетка-мишень представляет собой любую клетку, которая экспрессирует на клеточной поверхности антигены, которые могут распознавать исследуемые антитела. Примером такой клетки-мишени является эозинофил, который экспрессирует Siglec-8 на клеточной поверхности. Другим примером такой клетки-мишени является линия клеток (например, линия клеток Ramos), которая экспрессирует Siglec-8 на клеточной поверхности (например, Ramos 2C10). Клетки-мишени могут быть помечены реагентом, позволяющим обнаруживать цитолиз. Примеры реагентов для мечения включают радиоактивное вещество, такое как хромат натрия ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$). См., например, *Immunology*, 14, 181 (1968); *J. Immunol. Methods.*, 172, 227 (1994); и *J. Immunol. Methods.*, 184, 29 (1995).

В иллюстративном анализе для оценки АЗКЦ и апоптотической активности антител к Siglec-8 на тучных клетках тучные клетки человека выделяют из тканей или биологических жидкостей человека в соответствии с опубликованными протоколами (Guhl et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2011, 75:382-384; Kulka et al., *In Current Protocols in Immunology*, 2001, (John Wiley & Sons, Inc.)) или подвергают дифференцировке из гемопоэтических стволовых клеток человека, например, как описано Yokoi et al., *J Allergy Clin Immunol.*, 2008, 121:499-505. Очищенные тучные клетки ресуспендируют в полной среде RPMI в стерильном 96-луночном планшете с U-образным дном и инкубируют в присутствии или в отсутствие антител к Siglec-8 в течение 30 минут при концентрациях в диапазоне от 0,0001 нг/мл до 10 мкг/мл. Образцы инкубируют еще от 4 до 48 часов с очищенными натуральными клетками-киллерами (NK) или свежими PBL или без них, чтобы индуцировать АЗКЦ. Гибель клеток в результате апоптоза или АЗКЦ анализируют с помощью проточной цитометрии с использованием флуоресцентных конъюгированных антител для обнаружения тучных клеток (CD117 и FcεR1) и аннексина-V и 7AAD для различения живых и мертвых или умирающих клеток. Окрашивание аннексином-V и 7AAD проводят в соответствии с инструкциями производителя.

В некоторых аспектах антитело к Siglec-8, описанное в данном документе, ингибирует опосредованную тучными клетками активность. Триптаза тучных клеток использовалась в качестве биомаркера для определения общего числа тучных клеток и их активации. Например, общая и активная триптаза, а также гистамин, N-метилгистамин и 11-бета-простагландин F2 могут быть измерены в крови или моче для оценки уменьшения количества тучных клеток. См., например, публикацию заявки на патент США № US 20110293631, где приведен пример анализа активности тучных клеток.

Е. Получение антител

Описанное в данном документе антитело (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека) получают с использованием методик, доступных в данной области техники для получения антител, иллюстративные способы которых более подробно описаны в следующих разделах.

1. Фрагменты антител

Настоящее изобретение охватывает фрагменты антител. Фрагменты антител могут быть получены традиционными способами, такими как ферментативное расщепление, или рекомбинантными способами. В определенных ситуациях есть преимущество в том, чтобы использовать фрагменты антител, а не цельные антитела. Обзор некоторых фрагментов антител см. в Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134.

Были разработаны различные способы для получения фрагментов антител. Традиционно эти фрагменты получали путем протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); и Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Однако сейчас эти фрагменты можно получать непосредственно из рекомбинантных клеток-хозяев. Фрагменты антител Fab, Fv и ScFv все можно экспрессировать и секретировать из клеток E. coli, обеспечивая, таким образом, легкое получение больших количеств этих фрагментов. Фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител, обсуждаемых выше. Альтернативно, фрагменты Fab'-SH можно непосредственно выделять из E. coli и химически связывать с образованием фрагментов F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом фрагменты F(ab')₂ можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Фрагменты Fab и F(ab')₂ с повышенным in vivo временем полужизни, содержащие остатки эпитопа связывания рецептора реутилизации, описаны в патенте США № 5869046. Другие способы получения фрагментов антител очевидны для специалиста-практика. В определенных вариантах осуществления антитело представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (scFv). См. WO 93/16185; патенты США №№ 5571894; и 5587458. Только Fv и scFv имеют интактные сайты связывания, которые не содержат константные области; таким образом, они могут подходить для снижения неспецифического связывания во время in vivo применения. Слитые белки scFv можно конструировать для получения слияния эффекторного белка в амино- или карбокси-конце scFv. См. Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, выше. Фрагмент антитела также может представлять собой «линейное антитело», например, как описано в патенте США № 5641870. Такие линейные антитела могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

2. Гуманизированные антитела

Настоящее изобретение охватывает гуманизированные антитела. В данной области техники известны различные способы гуманизации нечеловеческих антител. Например, гуманизированное антитело может иметь один или более аминокислотных остатков, введенных в него из источника, отличного от человеческого. Эти нечеловеческие

аминокислотные остатки часто называются «импортными» остатками, которые, как правило, взяты из «импортного» переменного домена. Гуманизация в основном может быть выполнена по методу Винтера (Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven et al. (1988) *Science* 239:1534-1536), путем замены последовательностей гипервариабельной области на соответствующие последовательности человеческого антитела. Соответственно, такие «гуманизированные» антитела представляют собой химерные антитела (патент США № 4816567), в которых по существу менее чем интактный переменный домен человека был заменен соответствующей последовательностью из вида отличного от человека. На практике гуманизированные антитела, как правило, представляют собой человеческие антитела, в которых некоторые остатки гипервариабельной области и, возможно, некоторые остатки FR заменены остатками из аналогичных сайтов в антителах грызунов.

Выбор человеческих переменных доменов, как легких, так и тяжелых цепей, которые будут использоваться для создания гуманизированных антител, может быть важен для снижения антигенности. В соответствии с так называемым методом «наилучшего соответствия» последовательность переменного домена антитела грызуна (например, мыши) подвергают скринингу против всей библиотеки известных последовательностей переменного домена человека. Человеческая последовательность, которая будет ближайшей к последовательности грызуна, затем принимается в качестве человеческой каркасной области для гуманизированного антитела (Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. В другом способе используют конкретную каркасную область, полученную из консенсусной последовательности всех человеческих антител конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Одна и та же каркасная область можно использовать для нескольких разных гуманизированных антител (Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta et al. (1993) *J. Immunol.*, 151:2623.

Кроме того, обычно желательно, чтобы антитела были гуманизированы с сохранением высокой аффинности к антигену и других предпочтительных биологических свойств. Для достижения этой цели, в соответствии с одним способом гуманизированные антитела получают в процессе анализа родительских последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов, используя трехмерные модели родительских и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов широко доступны и известны специалистам в данной области техники. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают вероятные трехмерные конформационные структуры выбранных последовательностей-кандидатов иммуноглобулина. Изучение таких отображений позволяет провести анализ вероятной роли остатков в функционировании потенциально пригодных последовательностей иммуноглобулина, например, анализ остатков, которые влияют на способность потенциально пригодного иммуноглобулина связываться с антигеном. Следовательно, можно выбирать и объединять остатки FR из реципиентных и импортных

последовательностей таким образом, чтобы получить необходимую характеристику антитела, такую как повышенная аффинность к целевому(-ым) антигену(-ам). В общем случае остатки гипервариабельной области непосредственно и в наибольшей степени вовлечены в связывание антигена.

В определенных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению изменено для увеличения или уменьшения степени гликозилирования антитела. Гликозилирование полипептидов обычно либо является N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикарбоксильной группе, чаще всего серину или треонину, хотя также могут быть использованы 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Добавление или делецию сайтов гликозилирования в антителе, как правило, осуществляют путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, что создается или удаляется одна или более описанных выше трипептидных последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования). Изменение также может быть выполнено путем добавления, делеции или замены одного или более остатков серина или треонина в последовательности исходного антитела (для сайтов O-связанного гликозилирования).

Если антитело содержит область Fc можно изменять присоединенный к ней углевод. Например, антитела со зрелой углеводной структурой, в которых отсутствует фукоза, присоединенная к области Fc антитела, описаны в заявке на патент США № US 2003/0157108 (Presta, L.). См. также US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Антитела с разделяющим пополам N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) в углеводе, присоединенном к области Fc антитела, упоминаются в WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. и патенте США № 6602684, Umana et al. Антитела, имеющие по меньшей мере один остаток галактозы в олигосахариде, присоединенный к области Fc антитела, описаны в WO 1997/30087, Patel et al. См. также WO 1998/58964 (Raju, S.) и WO 1999/22764 (Raju, S.), в которых рассматриваются антитела с измененным углеводом, присоединенным к области Fc антитела. См. также US 2005/0123546 (Umana et al.) об антигенсвязывающих молекулах с модифицированным гликозилированием.

В определенных вариантах осуществления вариант гликозилирования содержит область Fc, где в углеводной структуре, присоединенной к области Fc, отсутствует фукоза. Такие варианты имеют улучшенную функцию АЗКЦ. Необязательно область Fc дополнительно содержит одну или более аминокислотных замен, которые дополнительно

улучшают АЗКЦ, например, замены в положениях 298, 333 и/или 334 области Fc (нумерация Eu для остатков). Примеры публикаций, связанных с «дефукозилированными» или «дефицитными по фукозе» антителами, включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Примеры линий клеток, продуцирующих дефукозилированные антитела, включают клетки Lec13 CHO, дефицитные по фукозилрованию белков, (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); заявка на патент США № 2003/0157108 A1, Presta, L; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., особенно в примере 11), и линии клеток с нокаутом, например, гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8, клетки с нокаутом CHO (см., например, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)), и клетки, сверхэкспрессирующие β 1,4-N-ацетилгликоминалтрансферазу III (GnT-III) и μ -маннозидазу аппарата Гольджи II (ManII).

В настоящем описании рассматриваются антитела, которые имеют пониженное содержание фукозы по сравнению с количеством фукозы в том же самом антителе, продуцируемом в клетке CHO дикого типа. Например, антитело имеет меньшее количество фукозы, чем если бы оно продуцировалось нативными клетками CHO (например, клеткой CHO, которая обеспечивают нативный паттерн гликозилирования, например, клеткой CHO, содержащей нативный ген FUT8). В определенных вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело к Siglec-8 представляет собой антитело, в котором менее около 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% или 1% N-связанных гликанов содержат фукозу. В определенных вариантах осуществления антитело к Siglec-8, представленное в данном документе, представляет собой антитело, в котором ни один из N-связанных гликанов на нем не содержит фукозу, т. е. в котором антитело вообще не содержит фукозу, или не содержит фукозу, или не фукозилировано, или афукозилировано. Количество фукозы может быть определено путем расчета среднего количества фукозы в сахарной цепи Asn297 относительно общего количества гликоструктур, присоединенных к Asn297 (например, комплексных, гибридных или содержащих большое количество маннозы структур), согласно данным масс-спектрометрии MALDI-TOF, как описано, например, в WO 2008/077546. Asn297 относится к остатку аспарагина, расположенному в положении 297 в области Fc (согласно нумерации Eu остатков области Fc); при этом Asn297 также может быть расположен на около ± 3 аминокислот выше или ниже положения 297, т.е. между положениями 294 и 300, вследствие незначительных вариаций последовательностей в антителах. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела не фукозилированы.

В одном варианте осуществления антитело изменено для улучшения его периода полужизни в сыворотке. Для увеличения времени полужизни антитела в сыворотке можно включить в антитело (особенно во фрагмент антитела) связывающий рецептор реутилизации эпитоп, как описано, например, в патенте США № 5739277. В контексте

данного документе термин «эпитоп связывания рецептора реутилизации» относится к эпитопу области Fc молекулы IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), который отвечает за увеличение периода полужизни в сыворотке *in vivo* для молекулы IgG (US 2003/0190311, патент США № 6821505; патент США № 6165745; патент США № 5624821; патент США № 5648260; патент США № 6165745; патент США № 6165745; патент США № 5624821; № 5834597).

Другой тип варианта представляет собой вариант аминокислотной замены. В этих вариантах по меньшей мере один аминокислотный остаток в молекуле антитела заменен другим остатком. Сайты, представляющие интерес для заместительного мутагенеза, включают гипервариабельные области, но также предполагаются изменения FR. Консервативные замены показаны в Таблице 5 под заголовком «предпочтительные замены». Если такие замены приводят к желательному изменению биологической активности, тогда могут быть внесены более существенные изменения, обозначенные как «иллюстративные замены» в таблице 5 или как дополнительно описано ниже в отношении классов аминокислот, и продукты должны быть подвергнуты скринингу.

Таблица 5.

Исходный остаток	Иллюстративные замены	Предпочтительные замены
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr

Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu

Существенные модификации биологических свойств антитела осуществляют путем выбора замен, которые существенно отличаются по своему влиянию на сохранение (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, в виде складчатой или спиральной конформации, (б) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте или (с) объема боковой цепи. Аминокислоты могут быть разделены на группы на основании сходства свойств их боковых цепей (описано в публикации A. L. Lehninger, in *Biochemistry*, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

- (1) неполярные: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) незаряженные полярные: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) кислые: Asp (D), Glu (E)
- (4) основные: Lys (K), Arg (R), His (H)

В альтернативном варианте встречающиеся в природе остатки можно поделить на группы на основании общих свойств боковых цепей:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены приводят к замене члена одного из этих классов на члена другого класса. Такие замещенные остатки также можно вносить в сайты консервативных замен или в оставшиеся (неконсервативные) сайты.

Один тип заменяемого варианта включает замену одного или более остатков гипервариабельной области исходного антитела (например, гуманизованное или человеческое антитело). Как правило, полученные варианты, выбранные для дальнейшей разработки, будут иметь модифицированные (например, улучшенные) биологические свойства относительно исходного антитела, из которого они образуются. Удобный способ генерации таких вариантов замен включает созревание аффинности с использованием фагового дисплея. Вкратце, несколько сайтов гипервариабельной области (например, 6-7 сайтов) подвергаются мутации для генерации всех возможных аминокислотных замен на каждом сайте. Образующиеся таким образом антитела экспонируются из филаментных фаговых частиц в виде слияний по меньшей мере с частью белка оболочки фага (например, продукт гена III M13), упакованного внутри каждой частицы. Затем подвергнутые фаговому дисплею варианты проверяют на их биологическую активность (например, аффинность связывания). Для того чтобы определить потенциальные сайты гипервариабельной области для модификации, можно провести сканирующий мутагенез

(например, сканирование аланином) для выявления остатков гипервариабельной области, вносящих значительный вклад в связывание антигена. В качестве альтернативы или дополнительно может быть полезно проанализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для определения точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами на замену в соответствии со способами, известными в данной области техники, в том числе описанными в данном документе. Как только такие варианты созданы, панель вариантов подвергается скринингу с использованием способов, известных в данной области техники, в том числе описанных в данном документе, и для дальнейшей разработки могут быть выбраны антитела с превышающими прочие свойствами в одном или более соответствующих анализах.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотной последовательности антитела, получают различными способами, известными в данной области техники. Эти методы включают, помимо прочего, выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотной последовательности) или получение с помощью олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее полученного варианта или невариантной версии антитела.

Может быть желательно ввести одну или более аминокислотных модификаций в область Fc антител по настоящему изобретению, тем самым создавая вариант области Fc. Вариант области Fc может содержать последовательность области Fc человека (например, области Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или более аминокислотных положениях, включая шарнирный цистеин. В некоторых вариантах осуществления вариант области Fc содержит область Fc IgG4 человека. В дополнительном варианте осуществления область Fc IgG4 человека содержит аминокислотную замену S228P, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, как в Kabat.

В соответствии с этим описанием и рекомендациями в данной области техники предполагается, что в некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению может содержать одно или более изменений по сравнению с аналогом антитела дикого типа, например, в области Fc. Эти антитела, тем не менее, будут сохранять по существу такие же характеристики, необходимые для терапевтического применения, по сравнению с их аналогами дикого типа. Например, считается, что в области Fc могут быть сделаны определенные изменения, которые приведут к изменению (т.е. улучшению или уменьшению) связывания C1q и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ), например, как описано в WO 99/51642. См. также Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821; и WO 94/29351 в отношении других примеров вариантов области Fc. WO 00/42072 (Presta) и WO 2004/056312 (Lowman) описаны варианты антител с улучшенным или пониженным связыванием с FcR. Содержание этих патентных публикаций специально включено в

данный документ посредством ссылки. См., например, Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Антитела с увеличенным периодом полужизни и улучшенным связыванием с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который отвечает за перенос материнских IgG к плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) и Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), описаны в US 2005/0014934 A1 (Hinton et al.). Данные антитела содержат область Fc с одной или более заменами в ней, которые улучшают связывание области Fc с FcRn. Варианты полипептидов с измененными аминокислотными последовательностями области Fc и повышенной или пониженной способностью связывания C1q описаны в патенте США № 6194551B1, WO99/51642. Содержание этих патентных публикаций специально включено в данный документ посредством ссылки. См. также Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

7. Векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные способы

Для рекомбинантной продукции антитела по настоящему изобретению кодирующую его нуклеиновую кислоту выделяют и встраивают в реплицируемый вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. ДНК, кодирующую антитело, легко выделяют и секвенируют с использованием традиционных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела). Доступно множество векторов. Выбор вектора частично зависит от используемой клетки-хозяина. Как правило, клетки-хозяева имеют либо прокариотическое, либо эукариотическое (как правило, из млекопитающих) происхождение. Следует понимать, что для этой цели можно использовать константные области любого изотипа, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области могут быть получены от человека или животного любого вида.

Получение антител с использованием прокариотических клеток-хозяев:

а) Конструкция вектора

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные компоненты антитела по настоящему изобретению, можно получать, используя стандартные рекомбинантные технологии. Необходимые полинуклеотидные последовательности можно выделять и секвенировать из вырабатывающих антитела клеток, таких как гибридомные клетки. В альтернативном варианте полинуклеотиды можно синтезировать, используя синтезатор нуклеотидов или технологии ПЦР. После получения последовательности, кодирующие полипептиды, вставляют в рекомбинантный вектор, способный к репликации и экспрессии гетерологичных полинуклеотидов в прокариотических хозяевах. Многие векторы, которые известны в данной области техники, можно использовать в целях настоящего изобретения. Выбор подходящего вектора будет зависеть главным образом от размера нуклеиновых кислот, подлежащих вставке в вектор, и конкретной клетки-хозяина, подлежащей трансформации вектором. Каждый вектор содержит различные компоненты в зависимости от его функции (амплификация или экспрессия гетерологичного полинуклеотида или и то, и другое) и его

совместимости с конкретной клеткой-хозяином, в которой он находится. Компоненты вектора, как правило, включают, но не ограничиваются ими: точку начала репликации, селективный маркерный ген, промотор, сайт связывания рибосомы (RBS), сигнальную последовательность, вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты и последовательность терминации транскрипции.

Как правило, плазмидные векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, которые получены из видов, совместимых с клеткой-хозяином. Вектор, как правило, несет сайт репликации, а также маркирующие последовательности, которые способны обеспечить фенотипическую селекцию в трансформированных клетках. Например, *E. coli*, как правило, трансформируют с использованием pBR322, плазмиды, полученной из вида *E. coli*. pBR322 содержит гены устойчивости к ампициллину (Amp) и тетрациклину (Tet), и, таким образом, обеспечивает простые средства для идентификации трансформированных клеток. pBR322, его производные или другие микробные плазмиды или бактериофаги могут также содержать или могут быть модифицированы так, чтобы содержать промоторы, которые могут быть использованы микробным организмом для экспрессии эндогенных белков. Примеры производных pBR322, используемых для экспрессии определенных антител, подробно описаны в Carter et al., патенте США № 5648237.

Кроме того, фаговые векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, совместимые с микроорганизмом-хозяином, могут быть использованы в качестве трансформирующих векторов в связи с этими хозяевами. Например, бактериофаг, такой как λ GEM.TM.-11, можно использовать для создания рекомбинантного вектора, который можно использовать для трансформации восприимчивых клеток-хозяев, таких как *E. coli* LE392.

Вектор экспрессии по настоящему изобретению может содержать две или более пар промотор-цистрон, кодирующих каждый из полипептидных компонентов. Промотор представляет собой нетранслируемую регуляторную последовательность, расположенную выше (5') цистрона, которая модулирует его экспрессию. Промоторы прокариот, как правило, делятся на два класса: индуцибельные и конститутивные. Индуцибельный промотор представляет собой промотор, который инициирует повышенные уровни транскрипции цистрона, находящегося под его контролем, в ответ на изменения условий культивирования, т.е. наличие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры.

Большое число промоторов распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами, хорошо известны. Выбранный промотор можно функционально связать с ДНК цистрона, которая кодирует легкую или тяжелую цепь, путем удаления промотора из исходной ДНК посредством расщепления рестриктазами и встраивания выделенной последовательности промотора в вектор по настоящему изобретению. Для прямой амплификации и/или экспрессии генов-мишеней можно использовать как нативную промоторную последовательность, так и множество гетерологичных

промоторов. В некоторых вариантах осуществления используются гетерологичные промоторы, поскольку они, как правило, обеспечивают более высокую транскрипцию и более высокие выходы экспрессированного гена-мишени по сравнению с нативным промотором полипептида-мишени.

Промоторы, подходящие для применения с прокариотическими хозяевами, включают промотор PhoA, системы промоторов β -галактамазы и лактозы, систему промоторов триптофана (*trp*) и гибридные промоторы, такие как промотор *tac* или *trc*. Однако также подходят другие промоторы, функционирующие в бактериях (например, другие известные бактериальные или фаговые промоторы). Их нуклеотидные последовательности были опубликованы, что позволяет квалифицированному специалисту с легкостью лигировать их с цистронами, кодирующими целевые легкие и тяжелые цепи (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269), используя линкеры или адаптеры для обеспечения любых необходимых сайтов рестрикции.

В одном аспекте настоящего изобретения каждый цистрон в рекомбинантном векторе содержит компонент сигнальной последовательности для секреции, который направляет транслокацию экспрессируемых полипептидов через мембрану. Как правило, сигнальная последовательность может быть компонентом вектора или частью ДНК полипептида-мишени, встроенной в вектор. Сигнальная последовательность, выбранная для целей настоящего изобретения, должна быть такой, которая распознается и процессируется (т.е. отщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют сигнальные последовательности, нативные для гетерологичных полипептидов, сигнальную последовательность заменяют прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы, состоящей из лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, *Irr* или термостабильного полипептида энтеротоксина II (STII), *LamB*, *PhoE*, *PelB*, *OmpA* и *MBP*. В одном варианте осуществления настоящего изобретения сигнальные последовательности, используемые в обоих цистронах системы экспрессии, представляют собой сигнальные последовательности STII или их варианты.

В еще одном аспекте продукция иммуноглобулинов в соответствии с настоящим изобретением может происходить в цитоплазме клетки-хозяина и, следовательно, не требует присутствия сигнальных последовательностей для секреции в каждом цистроне. В связи с этим легкие и тяжелые цепи иммуноглобулина экспрессируются, сворачиваются и собираются с образованием функциональных иммуноглобулинов в цитоплазме. Определенные штаммы-хозяева (например, штаммы *E. coli* *trxB*) обеспечивают условия цитоплазмы, благоприятные для образования дисульфидных связей, тем самым обеспечивая правильное сворачивание и сборку субъединиц экспрессированного белка. Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

Антитела по настоящему изобретению также могут быть получены с использованием системы экспрессии, в которой можно модулировать количественное соотношение экспрессируемых полипептидных компонентов, чтобы максимизировать

выход секретлируемых и надлежащим образом собранных антител по настоящему изобретению. Такая модуляция достигается, по меньшей мере частично, одновременной модуляцией интенсивности трансляции полипептидных компонентов.

Одна методика модуляции интенсивности трансляции раскрыта в Simmons et al., патенте США № 5840523. В ней используются варианты области инициации трансляции (TIR) в цистроне. Для данного TIR можно создать серию вариантов последовательностей аминокислот или нуклеиновых кислот с диапазоном интенсивности трансляции, тем самым обеспечивая удобные средства, с помощью которого можно регулировать этот фактор для желаемого уровня экспрессии конкретной цепи. Варианты TIR могут быть получены с помощью обычных методов мутагенеза, которые приводят к изменениям кодонов, которые могут изменить аминокислотную последовательность. В определенных вариантах осуществления изменения в нуклеотидной последовательности не выражены. Изменения в TIR могут включать, например, изменения количества или интервалов между последовательностями Шайна-Дальгарно, наряду с изменениями в сигнальной последовательности. Одним из способов создания мутантных сигнальных последовательностей является создание «банка кодонов» в начале кодирующей последовательности, который не изменяет аминокислотную последовательность сигнальной последовательности (т. е. изменения не проявляются). Это может быть достигнуто путем изменения третьего нуклеотидного положения каждого кодона; кроме того, некоторые аминокислоты, такие как лейцин, серин и аргинин, имеют несколько первых и вторых положений, что может добавить сложности при создании банка. Этот метод мутагенеза подробно описан в Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158.

В одном варианте осуществления создается набор векторов с диапазоном интенсивностей TIR для каждого цистрона в нем. Этот ограниченный набор обеспечивает сравнение уровней экспрессии каждой цепи, а также выход желаемых продуктов антител при различных комбинациях интенсивностей TIR. Интенсивность TIR можно определить путем количественного определения уровня экспрессии репортерного гена, как подробно описано в патенте США № 5840523 Simmons et al. На основании сравнения интенсивности трансляции выбирают желаемые отдельные TIR для объединения в конструкциях вектора экспрессии по настоящему изобретению.

Прокариотические клетки-хозяева, подходящие для экспрессии антител по настоящему изобретению, включают архебактерии и эубактерии, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы. Примеры полезных бактерий включают *Escherichia* (например, *E. coli*), *Bacilli* (например, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, виды *Pseudomonas* (например, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* или *Paracoccus*. В одном варианте осуществления используют грамотрицательные клетки. В одном варианте осуществления клетки *E. coli* используют в качестве хозяев по настоящему изобретению. Примеры штаммов *E. coli* включают штамм W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2

(Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; номер депонирования в ATCC 27325) и его производные, включая штамм 33D3, имеющий генотип W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT(Δ nmpr-fepE) degP41 kanR (патент США № 5639635). Другие штаммы и их производные, такие как *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* λ 1776 (ATCC 31,537) и *E. coli* RV308(ATCC 31,608) также подходят. Эти примеры являются скорее иллюстративными, чем ограничивающими. Способы конструирования производных любой из вышеупомянутых бактерий, имеющих определенные генотипы, известны в данной области техники и описаны, например, в Bass et al., *Proteins*, 8:309-314 (1990). Как правило, необходимо выбрать соответствующие бактерии, принимая во внимание воспроизводимость репликона в бактериальных клетках. Например, *E. coli*, виды *Serratia* или *Salmonella* могут быть подходящим образом использованы в качестве хозяина, когда для доставки репликона используются хорошо известные плазмиды, такие как pBR322, pBR325, pACYC177 или pKN410. Как правило, клетка-хозяин должна секретировать минимальные количества протеолитических ферментов, и в клеточную культуру желательно включать дополнительные ингибиторы протеазы.

б) Получение антитела

Клетки-хозяев трансформируют вышеописанными векторами экспрессии и культивируют в традиционных питательных средах, модифицированных при необходимости для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих необходимые последовательности.

Трансформация означает введение ДНК прокариотическому хозяину таким образом, чтобы ДНК могла реплицироваться либо как внехромосомный элемент, либо как хромосомный интегрант. В зависимости от используемой клетки-хозяина трансформацию проводят с использованием стандартных методик, подходящих для таких клеток. Обработка кальцием с использованием хлорида кальция, как правило, используется для бактериальных клеток, которые содержат существенные барьеры клеточной стенки. В еще одном методе трансформации используется полиэтиленгликоль/ДМСО. Еще одной используемой методикой является электропорация.

Прокариотические клетки, используемые для получения полипептидов по настоящему изобретению, выращивают в среде, известной в данной области техники и подходящей для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры подходящих сред включают среду Лурия (LB) с необходимыми питательными добавками. В некоторых вариантах осуществления среда также содержит селективный агент, выбранный на основе конструкции вектора экспрессии, для селективного обеспечения роста прокариотических клеток, содержащих вектор экспрессии. Например, ампициллин добавляют в среду для роста клеток, экспрессирующих ген устойчивости к ампициллину.

Любые необходимые добавки помимо источников углерода, азота и неорганических фосфатов также могут быть включены в соответствующих концентрациях, вводимых отдельно или в смеси с другой добавкой или средой, такой как

комплексный источник азота. Необязательно культуральная среда может содержать один или более восстанавливающих агентов, выбранных из группы, состоящей из глутатиона, цистеина, цистамина, тиогликолята, дитиозритрита и дитиотреитола.

Прокариотические клетки-хозяева культивируют при подходящих температурах. В определенных вариантах осуществления для роста *E.coli* температура находится в диапазоне от около 20°C до около 39°C; от около 25°C до около 37°C; или около 30°C. pH среды может быть любым в диапазоне от около 5 до около 9, в основном в зависимости от организма-хозяина. В определенных вариантах осуществления для *E. coli* pH составляет от около 6,8 до около 7,4 или около 7,0.

Если в векторе экспрессии по настоящему изобретению используется индуцируемый промотор, экспрессия белка индуцируется в условиях, подходящих для активации промотора. В одном аспекте настоящего изобретения промоторы *P_{hoA}* используются для контроля транскрипции полипептидов. Соответственно, трансформированные клетки-хозяева культивируют в среде с ограниченным содержанием фосфатов для индукции. В некоторых вариантах осуществления среда с ограниченным содержанием фосфатов представляет собой среду C.R.A.P. (см., например, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Можно использовать множество других индукторов в соответствии с используемой конструкцией вектора, как известно в данной области техники.

В одном варианте осуществления экспрессированные полипептиды по настоящему изобретению секретируются в периплазму клеток-хозяев и выделяют из нее. Извлечение белка, как правило, включает разрушение микроорганизма, как правило, такими средствами, как осмотический шок, обработка ультразвуком или лизис. После разрушения клеток клеточный дебрис или целые клетки можно удалить путем центрифугирования или фильтрования. Белки могут быть дополнительно очищены, например, путем хроматографии на аффинной смоле. Альтернативно, белки могут быть перенесены в культуральную среду и выделены из нее. Клетки могут быть удалены из культуры, а супернатант культуры отфильтрован и сконцентрирован для дальнейшей очистки полученных белков. Экспрессированные полипептиды могут быть дополнительно выделены и идентифицированы с использованием общеизвестных методов, таких как электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE) и вестерн-блоттинг.

В одном аспекте настоящего изобретения производство антител проводят в больших количествах в процессе ферментации. Для производства рекомбинантных белков доступны различные процедуры крупномасштабной периодической ферментации с подпиткой. Объем для крупномасштабной ферментации составляет по меньшей мере 1000 литров, а в некоторых вариантах осуществления, от около 1000 до 100000 литров. В этих ферментерах используются мешалки для распределения кислорода и питательных веществ, особенно глюкозы. Мелкомасштабная ферментация, как правило, относится к ферментации в ферментере, объем которого не превышает приблизительно 100 литров, и может варьироваться от около 1 литра до около 100 литров.

В процессе ферментации индукция экспрессии белка, как правило, инициируется после того, как клетки выращены в подходящих условиях до желаемой плотности, например, до около 180-220 при ОП550, при этом на этой стадии клетки находятся в ранней стационарной фазе. В соответствии с используемой конструкцией вектора можно использовать различные индукторы, известные в данной области техники и описанные выше. Клетки можно выращивать в течение более коротких периодов до индукции. Клетки, как правило, индуцируют в течение около 12-50 часов, хотя можно использовать большее или меньшее время индукции.

Для повышения выхода продукции и качества полипептидов по настоящему изобретению можно модифицировать различные условия ферментации. Например, для улучшения правильной сборки и фолдинга секретлируемых полипептидов антител можно использовать дополнительные векторы, сверхэкспрессирующие белки-шапероны, такие как белки Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD и/или DsbG) или FkpA (пептидил-пролил-цис/транс-изомеразу с шаперонной активностью) можно использовать для совместной трансформации прокариотических клеток-хозяев. Было продемонстрировано, что белки-шапероны облегчают правильный фолдинг и растворимость гетерологичных белков, продуцируемых в бактериальных клетках-хозяевах. Chen et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:19601-19605; Georgiou et al., патент США № 6083715; Georgiou et al., патент США № 6027888; Bothmann and Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie et al. (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

Для минимизации протеолиза экспрессированных гетерологичных белков (особенно тех, которые чувствительны к протеолизу), в настоящем раскрытии могут быть использованы определенные штаммы-хозяева, дефицитные по протеолитическим ферментам. Например, штаммы клеток-хозяев могут быть модифицированы для внесения генетических мутаций в гены, кодирующие известные бактериальные протеазы, такие как протеаза III, OmpT, DegP, Tsp, протеаза I, протеаза Mi, протеаза V, протеаза VI и их комбинации. Некоторые дефицитные по протеазе штаммы *E. coli* доступны и описаны, например, в Joly et al. (1998), см. выше; Georgiou et al., патенте США № 5264365; Georgiou et al., патенте США № 5508192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

В одном варианте осуществления штаммы *E. coli*, дефицитные по протеолитическим ферментам и трансформированные плазмидами, сверхэкспрессирующими один или более белков-шаперонов, используют в качестве клеток-хозяев в системе экспрессии по настоящему изобретению.

с) Очистка антител

В одном варианте осуществления белок антитела, полученный в соответствии с настоящим изобретением, подвергают дополнительной очистке с получением препаратов, которые являются по существу гомогенными для дальнейших анализов и применения. Можно использовать стандартные методы очистки белка, известные в данной области техники. Следующие процедуры являются примерами подходящих процедур очистки:

фракционирование на иммуноаффинных или ионообменных колонках, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на силикагеле или на катионообменной смоле, такой как DEAE, хроматофокусирование, ДСН-ПААГ-электрофорез, осаждение сульфатом аммония, и гель-фильтрация с использованием, например, Sephadex G-75.

В одном аспекте белок А, иммобилизованный на твердой фазе, используют для иммуноаффинной очистки продуктов антител по настоящему изобретению. Белок А представляет собой белок клеточной стенки размером 41 кДа из *Staphylococcus aureus*, который с высокой аффинностью связывается с областью Fc антител. Lindmark et al (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. Твердая фаза, на которой иммобилизован белок А, может представлять собой колонку, содержащую стеклянную или кремниевую поверхность, или стеклянную колонку с контролируемым размером пор, или колонку с кремниевой кислотой. В некоторых случаях колонка покрыта реагентом, например глицерином, для возможного предотвращения неспецифического прилипания загрязняющих веществ.

В качестве первого этапа очистки препарат, полученный из клеточной культуры, как описано выше, можно нанести на твердую фазу с иммобилизованным белком А, чтобы обеспечить специфическое связывание представляющего интерес антитела с белком А. Затем твердую фазу следует промыть для удаления загрязняющих веществ, которые неспецифически связываются с твердой фазой. Наконец, представляющее интерес антитело выделяют из твердой фазы путем элюирования.

Получение антител с использованием эукариотических клеток-хозяев:

Вектор для применения в эукариотической клетке-хозяине, как правило, включает один или более из следующих неограничивающих компонентов: сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или более маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

а) Компонент в виде сигнальной последовательности

Вектор для применения в эукариотической клетке-хозяине может также содержать сигнальную последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на N-конце представляющего интерес зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность может быть той, которая распознается и процессируется (т.е. отщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. При экспрессии клеток млекопитающих доступны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидеры, например, сигнал gD простого герпеса. ДНК такой области-предшественника лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующей антитело.

б) Точка начала репликации

Как правило, для векторов экспрессии млекопитающих компонент в виде точки начала репликации не требуется. Например, точку начала репликации SV40, как правило, можно использовать только потому, что она содержит ранний промотор.

с) Компонент в виде селективного гена

Векторы экспрессии и клонирования могут содержать селективный ген, также называемый селективным маркером. Иллюстративные селективные гены кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (b) восполняют дефицит ауксотрофов, где это уместно, или (с) обеспечивают важнейшие питательные вещества, недоступные в сложных питательных сред.

В одном примере схемы селекции используется лекарственное средство для остановки роста клетки-хозяина. Те клетки, которые успешно трансформируются гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарственному средству, и, таким образом, выживают в режиме селекции. В качестве примеров такой доминантной селекции используют следующие препараты: неомицин, микофеноловая кислота и гигромицин.

Другим примером подходящих селективируемых маркеров для клеток млекопитающих являются те, которые позволяют идентифицировать клетки, способные поглощать нуклеиновую кислоту антитела, такие как DHFR, тимидинкиназа, металлотионеин-I и -II, гены металлотионеина приматов, аденозиндезаминаза, орнитиндекарбоксилаза, и т. д.

Например, в некоторых вариантах осуществления клетки, трансформированные геном селекции DHFR, сначала идентифицируют путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, содержащей метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. В некоторых вариантах осуществления подходящей клеткой-хозяином при использовании DHFR дикого типа является линия клеток яичника китайского хомячка (CHO) с дефицитом по активности DHFR (например, ATCC CRL-9096).

Альтернативно, клетки-хозяева (особенно хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), трансформированные или котрансформированные последовательностями ДНК, кодирующими антитело, белок DHFR дикого типа и другой селективируемый маркер, такой как аминокликозид-3'-фосфотрансфераза (APH) могут быть отобраны путем роста клеток в среде, содержащей агент для селекции селективируемого маркера, такой как аминокликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418. См. патент США № 4965199. Клетки-хозяева могут включать NS0, CHOK1, CHOK1SV или их производные, включая линии клеток с дефицитом глутаминсинтетазы (GS). Способы применения GS в качестве селективируемого маркера клеток млекопитающих описаны в патенте США № 5122464 и патенте США № 5891693.

d) Компонент в виде промотора

Векторы экспрессии и клонирования, как правило, содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей представляющий интерес полипептид (например, антитело). Промоторные последовательности известны для эукариот. Например, практически все эукариотические гены имеют AT-богатую область, расположенную примерно на 25-30 нуклеотидов выше от сайта, где инициируется транскрипция. Другая последовательность, обнаруженная на

70-80 оснований выше от сайта начала транскрипции многих генов, представляет собой область CNCAAT, где N может быть любым нуклеотидом. На 3'-конце большинства эукариотических генов находится последовательность AATAAA, которая может служить сигналом для добавления поли(A)-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. В определенных вариантах осуществления любая или все эти последовательности могут быть надлежащим образом встроены в эукариотические векторы экспрессии.

Транскрипция из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, например, вируса полиомы, вируса оспы кур, аденовируса (такой как аденовирус 2), вируса папилломы крупного рогатого скота, вируса саркомы птиц, цитомегаловируса, ретровируса, вируса гепатита В и обезьяньего вируса 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, промотора актина или промотора иммуноглобулина, из промоторов белков теплового шока, при условии, что такие промоторы совместимы с системами клеток-хозяев.

Ранние и поздние промоторы вируса SV40 удобно получать в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит точку начала репликации вируса SV40. Непосредственно ранний промотор цитомегаловируса человека удобно получать в виде рестрикционного фрагмента HindIII E. Система для экспрессии ДНК в хозяевах-млекопитающих с использованием вируса папилломы крупного рогатого скота в качестве вектора описана в патенте США № 4419446. Модификация этой системы описана в патенте США № 4601978. См. также Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982), в которой описана экспрессия кДНК β -интерферона человека в клетках мыши под контролем промотора тимидинкиназы вируса простого герпеса. Альтернативно, в качестве промотора можно использовать длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

е) Компонент в виде энхансерного элемента

Транскрипция ДНК, кодирующей антитело по настоящему изобретению, высшими эукариотами часто усиливается путем вставки энхансерной последовательности в вектор. Многие энхансерные последовательности в настоящее время известны из генов млекопитающих (глобин, эластаза, альбумин, α -фетопротеин и инсулин). Однако, как правило, используют энхансер из вируса эукариотической клетки. Примеры включают энхансер SV40 на участке поздней репликации (п.н. 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса человека, энхансер раннего промотора мышинового цитомегаловируса, энхансер полиомы на участке поздней репликации и энхансеры аденовируса. См. также Yaniv, Nature 297:17-18 (1982), в которой описываются энхансерные элементы для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть сплайсирован в векторе в положении 5' или 3' по отношению к последовательности, кодирующей полипептид антитела, но, как правило, расположен в 5'-конце от промотора.

ф) Компонент терминации транскрипции

Векторы экспрессии, используемые в эукариотических клетках-хозяевах, могут также содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для

стабилизации мРНК. Такие последовательности, как правило, доступны из 5'- и иногда 3', нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК, кодирующей антитело. Одним из подходящих компонентов терминации транскрипции является область полиаденилирования бычьего гормона роста. См. WO 94/11026 и описанный в ней вектор экспрессии.

g) Селекция и трансформация клеток-хозяев

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторах, описанных в данном документе, включают клетки высших эукариот, описанные в данном документе, включая клетки-хозяева позвоночных. Размножение клеток позвоночных в культуре (тканевой культуре) стало стандартной процедурой. Примерами подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия почек эмбриона человека (293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клетки почки новорожденного хомяка (ВНК, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); мышинные клетки Сертоли (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой марышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; клетки CHOK1, клетки CHOK1SV или производные и линия гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют описанными выше векторами - экспрессии или клонирования для продуцирования антитела и культивируют в традиционных питательных средах, модифицированных, при необходимости для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

h) Культивирование клеток-хозяев

Клетки-хозяева, используемые для получения антитела по настоящему изобретению, можно культивировать в различных средах. Для культивирования клеток-хозяев подходят коммерчески доступные среды, такие как F10 Хэма (Sigma), минимальная питательная среда ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и среда Игла в модификации Дульбекко ((DMEM), Sigma). Кроме того, любую из сред, описанных в Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), патентах США №№ 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; или 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; или переиздании патента США 30985, можно использовать в качестве питательной среды для

клеток-хозяев. Любая из этих сред может быть при необходимости дополнена гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния и фосфата), буферами (такими как HEPES), нуклеотиды (такие как аденозин и тимидин), антибиотики (такие как лекарственное средство GENTAMYCIN™), микроэлементы (определяемые как неорганические соединения, как правило, присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкоза или эквивалентный источник энергии. Любые другие добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, известных специалистам в данной области техники. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., являются такими, которые ранее использовали для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и будут очевидны обычному специалисту в данной области техники.

i) Очистка антител

При использовании рекомбинантных методов антитело можно продуцировать внутриклеточно или непосредственно секретировать в среду. Если антитело продуцируется внутриклеточно, то на первом этапе частицы дебриса, либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты, могут быть удалены, например, путем центрифугирования или ультрафильтрации. Когда антитело секретируется в среду, супернатанты из таких систем экспрессии, как правило, можно сначала подвергнуть концентрированию с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрирования белка, например, устройства для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеазы, такой как PMSF, может быть включен в любую из вышеупомянутых стадий для ингибирования протеолиза, а антибиотики могут быть включены для предотвращения роста случайных загрязняющих веществ.

Композиция антител, приготовленная из клеток, может быть очищена, например, с помощью хроматографии с гидроксипатитом, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем аффинная хроматография является удобным методом. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изоформа любого домена Fc иммуноглобулина, который присутствует в антителе. Белок А можно использовать для очистки антител, основанных на тяжелых цепях $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека (Lindmark et al., J. Immunol. Methods 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендуется для всех изоформ мыши и для $\gamma 3$ человека (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). Матрица, к которой присоединен аффинный лиганд, может быть агарозой, но доступны и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с заданным размером пор или поли(стирендивинил)бензол, позволяют увеличить скорость потока и сократить время обработки по сравнению с агарозой. Если антитело содержит домен СН3, для очистки пригодна смола Wakerbond АВХ™ (J. T. Waker, Филлипсбург, штат Нью-Джерси). Другие методы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепарин - SEPHAROSE™, хроматография на анионо- или

катионообменной смоле (например, на колонке с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, ДСН-ПААГ-электрофорез и осаждение сульфатом аммония, также доступны в зависимости от антитела, которое необходимо выделить.

После любой стадии(-й) предварительной очистки смесь, содержащая представляющее интерес антитело и загрязняющие вещества, может быть подвергнута дополнительной очистке, например, путем хроматографии гидрофобного взаимодействия с низким рН с использованием буфера для элюирования при рН около 2,5-4,5, проводимой при низкой концентрации соли (например, около 0-0,25 М соли).

В общем, различные методологии получения антител для использования в исследованиях, тестировании и клиническом применении хорошо известны в данной области технологии, согласуются с вышеописанными методологиями и/или считаются подходящими специалистом в данной области техники для конкретного представляющего интерес антитела.

Получение нефукозилированных антител

В данном документе предложены способы получения антител с пониженной степенью фукозилирования. Например, рассматриваемые в данном документе способы включают, но не ограничиваются ими, применение линий клеток с дефицитом фукозилирования белка (например, клеток Lec13 CHO, клеток CHO с нокаутом гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы, клеток, сверхэкспрессирующих β 1,4-N-ацетилгликозилтрансферазу III и дополнительно сверхэкспрессирующих μ -маннозидазу II аппарата Гольджи и т.д.), и добавление аналога(-ов) фукозы в среду для культивирования клеток, используемую для получения антител. См. Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); заявку на патент США № US 2003/0157108 A1, Presta, L; WO 2004/056312 A1; Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); и патент США № 8574907. Дополнительные методы снижения содержания фукозы в антителах включают технологию Glymaxx, описанную в публикации заявки на патент США № 2012/0214975. Дополнительные методы снижения содержания фукозы в антителах также включают добавление одного или более ингибиторов гликозидазы в среду для культивирования клеток, используемую для получения антител. Ингибиторы гликозидазы включают α -глюкозидазу I, α -глюкозидазу II и α -маннозидазу I. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гликозидазы представляет собой ингибитор α -маннозидазы I (например, кифунензин).

В контексте данного документа термин «коровое фукозилирование» относится к присоединению фукозы («фукозилированию») к N-ацетилглюкозамину («GlcNAc») на восстанавливаемом конце N-связанного гликана. Также предложены антитела, продуцируемые такими способами, и их композиции.

В некоторых вариантах осуществления снижается фукозилирование сложных связанных с N-гликозидом сахарных цепей, связанных с областью Fc (или доменом). В контексте данного документа термин «сложная связанная с N-гликозидом сахарная цепь», как правило, связана с аспарагином 297 (в соответствии с нумерацией Kabat), хотя

сложная связанная с N-гликозидом сахарная цепь также может быть связана с другими остатками аспарагина. «Сложная связанная с N-гликозидом сахарная цепь» исключает тип сахарной цепи с высоким содержанием маннозы, в котором только манноза включена в невосстанавливающий конец коровой структуры, но включает 1) сложный тип, в котором невосстанавливающая концевая часть коровой структуры имеет одну или более ветвей галактоза-N-ацетилглюкозамина (также называемых «gal-GlcNAc»), а невосстанавливающая концевая часть Gal-GlcNAc необязательно содержит сиаловую кислоту, разделяющий пополам N-ацетилглюкозамин или т.п; или 2) гибридный тип, в котором невосстанавливающая концевая часть коровой структуры имеет обе ветви связанной с N-гликозидом сахарной цепи с высоким содержанием маннозы, и сложную связанную с N-гликозидом сахарную цепь.

В некоторых вариантах осуществления «сложная связанная с N-гликозидом сахарная цепь» включает сложный тип, в котором невосстанавливающая концевая часть коровой структуры не имеет ветви, имеет одну или более ветвей галактозо-N-ацетилглюкозамина (также называемых «gal-GlcNAc»), а невосстанавливающая концевая часть Gal-GlcNAc необязательно дополнительно имеет такую структуру, как сиаловая кислота, разделяющий пополам N-ацетилглюкозамин или тому подобное.

В соответствии с настоящими способами, как правило, только незначительное количество фукозы включается в сложную связанную с N-гликозидом сахарную цепь(-и). Например, в различных вариантах осуществления менее около 60%, менее около 50%, менее около 40%, менее около 30%, менее около 20%, менее около 15%, менее около 10%, менее около 5% или менее около 1% антитела имеют коровое фукозилирование фукозой в композиции. В некоторых вариантах осуществления по существу ни одно (т.е. менее около 0,5%) антитела не имеет корового фукозилирования фукозой в композиции. В некоторых вариантах осуществления более около 40%, более около 50%, более около 60%, более около 70%, более около 80%, более около 90%, более около 91%, более около 92%, более около 93%, более около 94%, более около 95%, более около 96%, более около 97%, более около 98% или более около 99% антитела не фукозилированы в композиции.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено антитело, в котором по существу ни одна (т. е. менее около 0,5%) связанных с N-гликозидом углеводных цепей не содержит остаток фукозы. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложено антитело, в котором по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела не являются фукозилированными.

Как описано выше, для экспрессии антитела можно использовать различные системы хозяин млекопитающее - вектор экспрессии. В некоторых вариантах осуществления в культуральную среду не добавляют фукозу. В некоторых вариантах осуществления в культуральную среду добавляют эффективное количество аналога фукозы. В этом контексте «эффективное количество» относится к количеству аналога, достаточному для уменьшения включения фукозы в сложную связанную с N-гликозидом сахарную цепь антитела на по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по

меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40% или по меньшей мере около 50%. В некоторых вариантах осуществления антитела, полученные с помощью способов по настоящему изобретению, содержат по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40% или по меньшей мере около 50% белка без корового фукозилирования (например, лишеного корового фукозилирования) по сравнению с антителами, полученными из клеток-хозяев, культивируемых в отсутствие аналога фукозы.

Содержание (например, соотношение) сахарных цепей, в которых фукоза не связана с N-ацетилглюкозамином на восстанавливающем конце сахарной цепи, по сравнению с сахарными цепями, в которых фукоза связана с N-ацетилглюкозамином на восстанавливающем конце сахарной цепи, может быть определено, например, как описано в Примерах. Другие способы включают гидразинолиз или ферментативное расщепление (см., например, *Biochemical Experimentation Methods 23: Method for Studying Glycoprotein Sugar Chain* (Japan Scientific Societies Press), под редакцией Reiko Takahashi (1989)), флуоресцентное мечение или радиоизотопное мечение высвобожденной сахарной цепи и затем разделение меченой сахарной цепи путем хроматографии. Кроме того, состав высвобождаемых сахарных цепей можно определить путем анализа цепей методом НРАЕС-РАD (см., например, *J. Liq Chromatogr.* 6:1557 (1983)). (См. в частности, публикацию заявки на патент США № 2004/0110282).

III. Промышленные изделия или наборы

В еще одном аспекте предложено промышленное изделие или набор, которые содержат жидкий состав или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, содержащую антитело к Siglec-8, описанное в данном документе (например, антитело, которое связывает Siglec-8 человека). Промышленное изделие или набор могут дополнительно содержать инструкции по применению антитела в способах по настоящему изобретению, например, для подкожного введения. В определенных вариантах осуществления индивид представляет собой человека.

Промышленное изделие или набор могут дополнительно содержать контейнер. Подходящие контейнеры включают, например, флаконы, флаконы (например, двухкамерные флаконы), шприцы (такие как однокамерные или двухкамерные шприцы) и пробирки. Контейнеры могут быть изготовлены из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит состав. В некоторых вариантах контейнер представляет собой стеклянный флакон.

Промышленное изделие или набор могут дополнительно содержать этикетку или листок-вкладыш, которые находятся на контейнере или связаны с ним, и могут указывать указания по восстановлению и/или применению состава. На этикетке или листке-вкладыше может быть дополнительно указано, что состав полезен или предназначен для подкожного введения для лечения и/или профилактики заболевания или нарушения по настоящему изобретению у индивида. Например, в некоторых вариантах осуществления этикетка или листок-вкладыш могут дополнительно указывать, что состав полезен или

предназначен для подкожного введения для лечения и/или профилактики одного или более заболеваний или нарушений, выбранных из группы, состоящей из: хронического риносинусита с сопутствующей астмой, аспирин ин-индуцированного респираторного заболевания, неатопической астмы с дебютом во взрослом возрасте с заболеванием синусов, хронической обструктивной болезни легких, фиброзной болезни, предфиброзной болезни, распространенного системного мастоцитоза, вялотекущего системного мастоцитоза (ISM), воспалительного заболевания кишечника (IBD), эозинофильного эзофагита (ЕОЕ), эозинофильного гастрита (EG), эозинофильного гастроэнтерита (EGE), эозинофильного колита (ЕОС), эозинофильного дуоденита, тучноклеточного гастрита или тучноклеточного гастроэнтерита, гастрита или гастроэнтерита с повышенным содержанием тучных клеток, синдрома раздраженного кишечника, синдрома раздраженного кишечника с повышенным содержанием тучных клеток, функционального заболевания желудочно-кишечного тракта, функциональной диспепсии, аллергического конъюнктивита, гигантоклеточного папиллярного конъюнктивита, хронической крапивницы, аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АВРА), аллергической астмы, астмы с эозинофильным или тучноклеточным фенотипом, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом (EGPA), целиакии, гастропареза, гиперэозинофильного синдрома, атопического дерматита, анафилаксии, ангионевротического отека, синдрома/нарушения активации тучных клеток и эозинофильного фасциита.

Контейнер, содержащий состав, может быть одноразовым или многоразовым флаконом, что позволяет повторно вводить восстановленный состав. Промышленное изделие или набор могут дополнительно содержать второй контейнер, содержащий подходящий разбавитель. Промышленное изделие или набор могут дополнительно содержать другие материалы, желательные с коммерческой, терапевтической и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и листы-вкладыши с инструкциями по применению.

В конкретном варианте осуществления в настоящем изобретении предложены наборы для введения однократной дозы. Такие наборы включают контейнер с водным составом терапевтического антитела, включая предварительно заполненные шприцы с одной или более камерами. Иллюстративные предварительно заполненные шприцы доступны от Vetter GmbH, Равенсбург, Германия.

В еще одном варианте осуществления в данном документе представлено промышленное изделие или набор, содержащие составы, описанные в данном документе, для введения с помощью автоматического инъектора. Автоматический инъектор можно описать как устройство для проведения инъекции, которое после активации доставляет свое содержимое без дополнительных действий со стороны пациента или человека, производящего введение. Они особенно хорошо подходят для самостоятельного введения терапевтических составов, когда частота доставки должна быть постоянной, а время доставки превышает несколько секунд.

Понятно, что аспекты и варианты осуществления, описанные в данном документе,

предназначены только для иллюстративных целей и что различные модификации или изменения в их свете будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в сущность и сферу применения этой заявки и объема прилагаемой формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

Данное изобретение будет более полно понято со ссылкой на следующие примеры. Однако примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены только для иллюстративных целей и что различные модификации или изменения в их свете будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в сущность и сферу применения этой заявки и объема прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1: Подбор оптимального pH для составов антител к Siglec-8 для подкожного введения

В следующих примерах описаны эксперименты, направленные на определение подходящих условий состава для подкожного введения антитела к Siglec-8 AK002 (гуманизированное афукозилированное антитело, содержащее тяжелую цепь, включающую последовательность SEQ ID NO: 75, и легкую цепь, включающую последовательность SEQ ID NO:76). Существующие коммерческие продукты с высокими концентрациями, как правило, готовят в гистидиновых буферах с условиями pH 5,5-6,3 и концентрацией сахара 5-9%. В качестве предварительного исследования состава с высокой концентрацией антитела к Siglec-8 использовали различные буферные растворы в зависимости от их рКа для скрининга желаемого диапазона pH. Добавление эксципиента также оценивали, сравнивая эффекты сахаров, соли и аргинина. Оптимальность состава было основано на поддержании продукта в растворе в высокой концентрации в течение определенного периода времени при незначительном или полном отсутствии увеличения мутности продукта или образования агрегатов.

Материалы и способы

Исходным материалом, использованным в исследованиях по разработке составов для подкожного введения, была замороженная лекарственная субстанция (ЛС) согласно GMP. Перед повторной обработкой ЛС оттаивали при температуре окружающей среды. Размороженную ЛС повторно очищали для удаления полисорбата-80 перед началом исследований.

На основании проведенного исследования аликвоты повторно обработанного материала подвергали диализу в соответствующем тестируемом буфере с использованием кассет для диализа с порогом отсека по молекулярной массе 10 кДа (MWCO). Диализованный материал переносили на фильтры для центрифугирования Amicon с MWCO 30 кДа. Пулы продуктов концентрировали до точки, при которой мутность была видимой, или при отсутствии мутности желаемая концентрация достигалась с использованием настольной центрифуги Eppendorf, работающей при 3000 gcf.

Концентрации конечного продукта анализировали по УФ-поглощению при 280 нм с использованием спектрофотометра Perkin Elmer. Эксципиенты в виде хлорида натрия, аргинина, сахарозы и трегалозы были добавлены для оценки воздействия эксципиентов на концентрированные образцы. Мутность анализировали по УФ-поглощению при 340 нм, также используя спектрофотометр Perkin Elmer. pH концентрированных пулов подтверждали с помощью pH-метра Mettler Toledo, а образцы оценивали визуально с использованием полистироловых кювет. Учитывая оптимальность состава, некоторые пулы были проанализированы с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии (ЭХ) для оценки содержания мономера. Концентрированные пулы хранили в холодильнике при температуре 2-8 °С для оценки влияния температуры на образцы. Пулы образцов, показавшие наибольшую стабильность продукта после хранения при температуре 2-8 °С, будут дополнительно оценены в последующих исследованиях.

Концентрация материала антител при различных значениях pH позволяла визуально оценить мутность. Мутность дополнительно подтверждали анализом светорассеяния при УФ-поглощении 340 нм. Образцы также анализировали методом эксклюзионной хроматографии (ЭХ) для оценки содержания мономеров и агрегатов.

Результаты

Диапазон для подбора оптимального pH от 5,0 до 7,2 тестировали с использованием различных буферов. Для оценки продукта анти-Siglec-8 при pH 7,2 использовали 15 мМ калий-фосфатный буфер. Пул фосфата калия концентрировали от 11,0 мг/мл до 110 мг/мл (10-кратный коэффициент концентрирования). Во время концентрирования мутность отмечали примерно при 32 мг/мл и она постепенно становилось все более интенсивной по мере увеличения концентрации пула. **На Фиг. 1** показано изменение мутности при концентрировании пула фосфата калия.

15 мМ L-гистидиновый буфер использовали для оценки продукта анти-Siglec-8 при pH 6,4. Пул L-гистидина концентрировали от 11,0 мг/мл до 185 мг/мл (17-кратный коэффициент концентрирования). Во время концентрирования не наблюдали появление мутности, но продукт демонстрировал признаки высокой вязкости при 185 мг/мл. После 1 часа выдержки при температуре окружающей среды происходило затвердевание или гелеобразование образца при концентрации 185 мг/мл. После хранения в течение ночи при температуре окружающей среды пул 15 мМ L-гистидина в концентрации 185 мг/мл полностью превратился в гель. **На Фиг. 2** показано изменение мутности во время концентрирования пула гистидина.

Для оценки продукта анти-Siglec-8 при pH 6,0 использовали 15 мМ натрий-сукцинатный буфер. Пул сукцината натрия концентрировали от 18,0 мг/мл до 170 мг/мл (9-кратный коэффициент концентрирования). Во время концентрирования мутность отмечали примерно при 120 мг/мл и она постепенно становилось все более интенсивной по мере увеличения концентрации пула. После 1 часа при температуре окружающей среды произошло образование геля. **На Фиг. 3** показано изменение мутности во время концентрирования сукцината натрия в пуле с pH 6,0.

15 мМ натрий-сукцинатный буфер также использовали для оценки продукта анти-Siglec-8 при рН 5,6. Пул сукцината натрия концентрировали от 10,0 мг/мл до 165 мг/мл (16-кратный коэффициент концентрирования). Во время концентрирования мутность отмечали примерно при 125 мг/мл и она постепенно становилось все более интенсивной по мере увеличения концентрации пула. Сильная мутность стала очевидной через 1 час при температуре окружающей среды, а образование геля произошло через 3 дня при температуре окружающей среды. **На Фиг. 4** показано изменение мутности во время концентрирования сукцината натрия в пуле с рН 5,6.

Для оценки продукта анти-Siglec-8 при рН 5,0 использовали 15 мМ натрий-ацетатный буфер. Пул ацетата натрия концентрировали от 17,0 мг/мл до 190 мг/мл (11-кратный коэффициент концентрирования). Во время концентрирования не наблюдалось появления мутности, но продукт имел признаки умеренной вязкости при 190 мг/мл. См. **Фиг. 5** для изменения мутности продукта во время концентрирования ацетата натрия. В образце с концентрацией 190 мг/мл не наблюдали появления мутности или гелеобразования в течение 7 дней при 5°C. См. таблицу А для всех условий образца и результатов.

Таблица А. Результаты подбора оптимального рН.

Буфер	рН	Начальная концентрация (мг/мл)	Конечная концентрация (мг/мл)	Визуальное наблюдение при конечной концентрации
15 мМ фосфата калия	7,2	11,0	110,0	Высокая мутность
15мМ L-гистидина	6,4	11,0	185,0	Прозрачный, светло-желтого цвета
15мМ сукцината натрия	6,0	18,0	170,0	Высокая мутность
15мМ сукцината натрия	5,6	10,0	165,0	Высокая мутность
15мМ ацетата натрия	5,0	17,0	190,0	Прозрачный, светло-желтого цвета

В заключение, буферы на основе ацетата натрия, сукцината натрия, гистидина и фосфата калия использовали для оценки диапазона рН на основе их рКа. Гистидиновые и натрий-ацетатные буферы позволяли концентрировать антитела к Siglec-8 без мутности. Было обнаружено, что антитело образует гели при высокой концентрации в натрий-сукцинатном буфере при рН 5,6 или 6,0.

Пример 2: Подбор оптимальных эксципиентов для составов антител к Siglec-8 для подкожного введения

В этом примере эксципиенты добавляли к различным буферным растворам для оценки мутности, как описано в Примере 1 выше.

Антитело к Siglec-8 в 15 мМ калий-фосфатном буфере с рН 7,2 концентрировали до 110 мг/мл. К первому образцу добавляли аргинин до достижения концентрации 320 мМ. При конечной концентрации 85 мг/мл пул был прозрачным в нулевой момент времени и на 3-й день как при температуре окружающей среды, так и при 5 °С. Ко второму образцу добавляли сахарозу до достижения концентрации 540 мМ. При конечной концентрации 70 мг/мл пул был умеренно мутным в нулевой момент времени. К третьему образцу добавляли хлорид натрия до достижения концентрации 500 мМ. При конечной концентрации 80 мг/мл пул был сильно мутным в нулевой момент времени. На **Фиг. 6** показано сравнение мутности четырех образцов при рН 7,2.

Антитело к Siglec-8 в 15 мМ гистидиновом буфере с рН 6,4 концентрировали до 185 мг/мл. К первому образцу добавляли аргинин до достижения концентрации 100 мМ. При конечной концентрации 165 мг/мл пул был умеренно мутным в нулевой момент времени и сильно мутным в 1-й день с началом гелеобразования. Ко второму образцу добавляли сахарозу до достижения концентрации 260 мМ. При конечной концентрации 150 мг/мл пул был умеренно мутным в нулевой момент времени и прозрачным через 1 день инкубации при температуре окружающей среды. Пул сахарозы оставался прозрачным в течение > 1 месяца при 5 °С. К третьему образцу добавляли хлорид натрия до достижения концентрации 140 мМ. При конечной концентрации 165 мг/мл пул был сильно мутным в нулевой момент времени и в 1 день при температуре окружающей среды с началом гелеобразования. На **Фиг. 7** показано сравнение мутности четырех образцов при рН 6,4.

Антитело к Siglec-8 в 15 мМ натрий-сукцинатном буфере, рН 5,6, концентрировали до 165 мг/мл. К первому образцу добавляли аргинин до достижения концентрации 100 мМ. При конечной концентрации 150 мг/мл пул был слегка мутным в нулевой момент времени и умеренно мутным на 3-й день при температуре окружающей среды. Ко второму образцу добавляли сахарозу до достижения концентрации 260 мМ. При конечной концентрации 130 мг/мл пул был прозрачным в нулевой момент времени и прозрачным через 3 дня при температуре окружающей среды. К третьему образцу добавляли хлорид натрия до достижения концентрации 140 мМ. При конечной концентрации 150 мг/мл пул был сильно мутным в нулевой момент времени с началом гелеобразования на 3-й день при температуре окружающей среды. На **Фиг. 8** показано сравнение мутности четырех образцов при рН 5,6.

Антитело к Siglec-8 в 15 мМ натрий-ацетатном буфере с рН 5,0 концентрировали до 190 мг/мл. К первому образцу добавляли аргинин до достижения концентрации 100 мМ. При конечной концентрации 170 мг/мл пул был прозрачным в нулевой момент времени и оставался прозрачным в течение 7 дней при 5 °С. Ко второму образцу добавляли сахарозу до достижения концентрации 260 мМ. При конечной концентрации 155 мг/мл пул был прозрачным в нулевой момент времени и оставался прозрачным в

течение 7 дней при 5°C. К третьему образцу добавляли хлорид натрия до достижения концентрации 140 мМ. При конечной концентрации 170 мг/мл пул был прозрачным в нулевой момент времени и оставался прозрачным в течение 7 дней при 5 °С. В таблицу В включены результаты исследований по добавлению эксципиентов.

Таблица В. Результаты исследований по добавлению эксципиентов

Буфер	Эксципиенты	Конечная концентрация (мг/мл)	Визуальное наблюдение при конечной концентрации
15 мМ фосфата калия, рН 7,2	Аргинин, 320 мМ	85,0	Прозрачность до 3 дней при 5 °С
	Сахароза, 540 мМ	70,0	Умеренная мутность при Т=0
	Хлорид натрия, 500 мМ	80,0	Сильная мутность при Т=0
15мМ L-гистидина, рН 6,4	Аргинин, 100 мМ	165,0	Умеренная мутность при Т=0
	Сахароза, 260 мМ	150,0	Прозрачность до 1 месяца при 5 °С
	Хлорид натрия, 140 мМ	165,0	Сильная мутность при Т=0
15 мМ сукцината натрия, рН 5,6	Аргинин, 100 мМ	150,0	Незначительная мутность при Т=0
	Сахароза, 260 мМ	130,0	Прозрачность до 3 дней при КТ
	Хлорид натрия, 140 мМ	150,0	Сильная мутность при Т=0
15 мМ ацетата натрия, рН 5,0	Аргинин, 100 мМ	170,0	Прозрачность до 7 дней при 5 °С
	Сахароза, 260 мМ	155,0	Прозрачность до 7 дней при 5 °С
	Хлорид натрия, 140 мМ	170,0	Прозрачность до 7 дней при 5 °С

Пример 3: Подбор оптимальных комбинаций рН и эксципиентов для составов антител к Siglec-8 для подкожного введения

На основании положительных данных о буфере и эксципиенте из предыдущих

исследований, добавление эксципиента в виде сахарозы и трегалозы сочеталось с диапазоном рН с использованием ацетата натрия и гистидина для оценки мутности. 5 мМ ацетата натрия с 260 мМ сахарозы или 260 мМ трегалозы оценивали при рН 5,0, 5,3 и 5,6. 15 мМ гистидина с 260 мМ сахарозы или 260 мМ трегалозы оценивали при рН 5,5, 5,8 и 6,1.

Три аликвоты антитела к Siglec-8 в 15 мМ ацетата натрия при рН 5,0, 5,3 и 5,6 концентрировали от 11,0 мг/мл до 175 мг/мл. После анализа рН было отмечено, что рН каждого пула увеличился примерно на 0,2-0,3 единицы, что позволяет предположить наличие эффекта Гиббса-Доннана. Контрольные образцы (рН 5,3, рН 5,6 и рН 5,8 при ~175 мг/мл) хранили при температуре окружающей среды. Всего было создано шесть образцов для исследования. Два образца с рН 5,3, два с рН 5,6 и два с рН 5,8. Сахарозу добавляли к первому набору образцов (рН 5,3, 5,6 и 5,8) до достижения концентрации 260 мМ. Конечные концентрации для всех исследуемых образцов с сахарозой составляли ~140 мг/мл. Образцы хранили при температуре 5 °С для оценки мутности в зависимости от времени. Все образцы с сахарозой оставались прозрачными в течение 14 дней при 5 °С. Трегалозу добавляли ко второму набору образцов (рН 5,3, 5,6 и 5,8) до достижения концентрации 260 мМ. Конечные концентрации для всех исследуемых образцов с трегалозой составляли ~130 мг/мл. Образцы хранили при температуре 5 °С для оценки мутности в зависимости от времени. Все образцы с трегалозой оставались прозрачными в течение 14 дней при 5 °С. Визуальные наблюдения за всеми полученными образцами ацетата натрия показаны в таблице С.

Таблица С. Результаты визуального наблюдения для эксципиента в виде ацетата натрия и диапазона рН

Буфер	Эксципиенты	Конечная концентрация (мг/мл)	Визуальное наблюдение при конечной концентрации
15 мМ ацетата натрия, рН 5,3	260 мМ сахарозы	140,0	Прозрачность до 14 дней при 5 °С
15 мМ ацетата натрия, рН 5,6	260 мМ сахарозы	140,0	Прозрачность до 14 дней при 5 °С
15 мМ ацетата натрия, рН 5,8	260 мМ сахарозы	140,0	Прозрачность до 14 дней при 5 °С
15 мМ ацетата натрия, рН 5,3	260 мМ трегалозы	130,0	Прозрачность до 14 дней при 5 °С
15 мМ ацетата натрия, рН 5,6	260 мМ трегалозы	130,0	Прозрачность до 14 дней при 5 °С

15 мМ ацетата натрия, рН 5,8	260 мМ трегалозы	130,0	Прозрачность до 14 дней при 5 °С
---------------------------------	---------------------	-------	-------------------------------------

Мутность образца с ацетатом натрия анализировали методом светорассеяния с использованием УФ-поглощения при 340 нм. Результаты анализа светорассеяния ацетата натрия представлены в таблице D.

Таблица D. Результаты анализа светорассеяния для эксципиента в виде ацетата натрия и диапазона рН

Описание образца	T=0	3 день, КТ	14 день, 2-8 С
Ацетатный контроль, рН 5,3	0,397	0,382	0,406
Ацетат/Сахароза, рН 5,3	0,329	0,324	0,374
Ацетат/Трегалоза, рН 5,3	0,314	0,313	0,334
Ацетатный контроль, рН 5,6	0,426	0,425	0,472
Ацетат/Сахароза, рН 5,6	0,362	0,370	0,400
Ацетат/Трегалоза, рН 5,6	0,335	0,333	0,358
Ацетатный контроль, рН 5,8	0,409	0,429	0,442
Ацетат/Сахароза, рН 5,8	0,344	0,337	0,364
Ацетат/Трегалоза, рН 5,8	0,319	0,326	0,351

Три аликвоты антитела к Siglec-8 в 15 мМ гистидина при рН 5,5, 5,8 и 6,1 концентрировали от 11,0 мг/мл до 175 мг/мл. После анализа рН было обнаружено незначительное изменение рН после концентрирования. Контрольные образцы (рН 5,5, рН 5,8 и рН 6,1 при ~175 мг/мл) хранили при температуре окружающей среды. Всего было создано шесть образцов для исследования. Два образца с рН 5,5, два с рН 5,8 и два с рН 6,1. Сахарозу добавляли к первому набору образцов (рН 5,5, 5,8 и 6,1) до достижения концентрации 260 мМ. Конечные концентрации для всех исследуемых образцов с сахарозой составляли ~142 мг/мл. Образцы хранили при температуре 5 °С для оценки мутности в зависимости от времени. Все образцы с сахарозой оставались прозрачными в течение 14 дней при 5°С. Трегалозу добавляли ко второму набору образцов (рН 5,5, 5,8 и 6,1) до достижения концентрации 260 мМ. Конечные концентрации для всех исследуемых образцов с трегалозой составляли ~132 мг/мл. Образцы хранили при температуре 5 °С для оценки мутности в зависимости от времени. Все образцы с трегалозой оставались прозрачными в течение 14 дней при 5 °С. Визуальные наблюдения за всеми полученными образцами с гистидином показаны в таблице E.

Таблица E. Результаты визуального наблюдения для эксципиента в виде гистидина и диапазона рН

Буфер	Эксципиенты	Конечная концентрация (мг/мл)	Визуальное наблюдение при конечной
-------	-------------	-------------------------------	------------------------------------

			концентрации
15 мМ гистидина, рН 5,5	260 мМ сахарозы	142,0	Прозрачность до 14 дней при 5 °С
15 мМ гистидина, рН 5,8	260 мМ сахарозы	142,0	Прозрачность до 14 дней при 5 °С
15 мМ гистидина, рН 6,1	260 мМ сахарозы	142,0	Прозрачность до 14 дней при 5 °С
15 мМ гистидина, рН 5,5	260 мМ трегалозы	132,0	Прозрачность до 14 дней при 5 °С
15 мМ гистидина, рН 5,8	260 мМ трегалозы	132,0	Прозрачность до 14 дней при 5 °С
15 мМ гистидина, рН 6,1	260 мМ трегалозы	132,0	Прозрачность до 14 дней при 5 °С

Мутность образца с гистидином анализировали методом светорассеяния с использованием УФ-поглощения при 340 нм. Результаты анализа светорассеяния для гистидина представлены в таблице F.

Таблица F. Результаты анализа светорассеяния для эксципиента в виде гистидина и диапазона рН

Описание образца	T=0	2 день, КТ	14 день, 2-8 С
Гистидиновый контроль, рН 5,5	0,411	0,415	0,448
Гистидин/Сахароза, рН 5,5	0,356	0,344	0,378
Гистидин/Трегалоза, рН 5,5	0,329	0,325	0,359
Гистидиновый контроль, рН 5,8	0,424	0,436	0,511
Гистидин/Сахароза, рН 5,8	0,351	0,359	0,416
Гистидин/Трегалоза, рН 5,8	0,350	0,340	0,390
Гистидиновый контроль, рН 6,1	0,419	0,437	0,495
Гистидин/Сахароза, рН 6,1	0,368	0,380	0,408
Гистидин/Трегалоза, рН 6,1	0,344	0,340	0,399

Образцы с гистидином анализировали на содержание мономера с использованием аналитической эксклюзионной хроматографии (ЭХ). Результаты анализа методом ЭХ

гистидина показаны в таблице G.

Таблица G. Результаты ЭХ для эксципиента в виде гистидина и диапазона pH

Описание образца	Момент времени	Мономер (%)	Агрегат (%)
Гистидиновый контроль, pH 5,5	T=0	99,43	0,58
Гистидин+260 мМ сахарозы, pH 5,5	14 день 5С	99,39	0,61
Гистидин+260 мМ трегалозы, pH 5,5	14 день 5С	99,39	0,61
Гистидиновый контроль, pH 5,8	T=0	99,42	0,59
Гистидин+260 мМ сахарозы, pH 5,8	14 день 5С	99,38	0,62
Гистидин+260 мМ трегалозы, pH 5,8	14 день 5С	99,37	0,63
Гистидиновый контроль, pH 6,1	T=0	99,42	0,58
Гистидин+260 мМ сахарозы, pH 6,1	14 день 5С	99,35	0,65
Гистидин+260 мМ трегалозы, pH 6,1	14 день 5С	99,37	0,63

Были проведены исследования для подтверждения эффекта Гиббса-Доннана, наблюдаемого в ходе предыдущих экспериментов. В первом исследовании антитело к Siglec-8 в 15 мМ ацетате натрия, pH 5,20, концентрировали до ~210 мг/мл. После концентрирования в пуле pH 5,44 увеличился на 0,24 единицы pH. Во втором исследовании антитело к Siglec-8 в 15 мМ гистидина, pH 5,70, концентрировали до ~195 мг/мл. После концентрирования в пуле pH 5,89 увеличился на 0,19 единицы pH. Результаты pH показаны в таблице H.

Таблица H. Результаты для эксципиента в виде гистидина и диапазона pH

Буфер	Исходная концентрация (мг/мл)	Конечная концентрация (мг/мл)	Исходный pH	Конечный pH	изменение pH
15мМ ацетата натрия	18,0	210,0	5,20	5,44	0,24
15 мМ гистидина	18,0	195,0	5,70	5,89	0,19

Выводы

Исследования по подбору оптимального pH показали, что молекула антитела к Siglec-8 более стабильна в диапазоне pH 5,0-6,4. Оценка диапазона pH показала, что антитело выпадает из раствора при $\text{pH} \geq 6,4$ независимо от буфера. В буфере pH 7,2 молекула начинала выпадать в осадок, поскольку при концентрации 32 мг/мл наблюдали появление мутности, которое постепенно ухудшалось при дальнейшем концентрировании. Для молекулы антитела также предпочтительны определенные буферные растворы. Как показано в таблице A, молекула в высокой концентрации (>165 мг/мл) оставалась в

растворе в течение продолжительного периода времени в 15 мМ ацетата, рН 5,0, и 15 мМ L-гистидина, рН 6,4, но осаждается в 15 мМ сукцинатном буфере при рН 5,6 и 6,0.

При добавлении специфических эксципиентов стабильность молекулы при высокой концентрации улучшалась. При рН 5,0, 5,6 и 6,4 пулы с высокой концентрацией (≥ 130 мг/мл) в присутствии 260 мМ сахарозы оставались прозрачными в течение продолжительного периода времени. Дальнейшие эксперименты подтвердили, что раствор молекулы антитела к Siglec-8 в высокой концентрации (≥ 130 мг/мл) в присутствии сахаров (260 мМ сахарозы и 260 мМ трегалозы) оставался прозрачным при 5 °С в течение > 14 дней. Результаты анализа светорассеяния показали снижение поглощения при 340 нанометрах для образцов, содержащих сахара, по сравнению с контрольным образцом без сахаров. Результаты анализа методом ЭХ также подтвердили стабильность молекулы, поскольку содержание мономера не изменилось после 14 дней хранения при 5 °С. Эффект Гиббса-Доннана был подтвержден в ходе исследований высоких концентраций и становился более очевидным по мере достижения более высоких концентраций продукта. К удивлению, эффект высаливания наблюдали в присутствии аргинина в высокой концентрации, а также наблюдали в присутствии хлорида натрия. Наиболее оптимальными условиями были рН 5,0-6,3, гистидиновый или натрий-ацетатный буфер, сахароза от 5% до 9%, трегалоза от 4% до 10% и концентрация антител ≥ 150 мг/мл.

Информация, полученная в ходе этих первоначальных исследований по разработке состава с высокой концентрацией, предполагает составление молекулы антитела к Siglec-8 в диапазоне рН от 5,0 до 6,4 с использованием натрий-ацетатного или L-гистидинового буферов в присутствии сахаров для достижения желаемой долговременной стабильности.

Пример 4: Исследование фазы I для оценки безопасности, переносимости и биодоступности подкожно вводимого антитела к Siglec-8 у взрослых здоровых добровольцев

Антитело к Siglec-8, описанное в Примерах 1 и 2, вводимое в виде внутривенной инфузии каждые 4 недели, ранее было протестировано на здоровых добровольцах и на субъектах с вялотекущим системным мастоцитозом (ISM), хронической крапивницей, тяжелым аллергическим конъюнктивитом (AC), и эозинофильным гастритом (EG) и/или эозинофильным дуоденитом (EoD), ранее именуемым эозинофильным гастроэнтеритом (EGE). Многократные дозы 3 мг/кг вводили субъектам с ISM, крапивницей, тяжелой формой AC, а также субъектам с EG/EoD. В этих исследованиях фармакодинамическая (ФД) активность антитела к Siglec-8 и ослабление симптомов заболевания наблюдали в течение продолжительных периодов времени, а фармакокинетические (ФК) параметры антитела продемонстрировали длительный период полужизни, позволяющий вводить его каждые 4 недели.

На сегодняшний день в клинические исследования были включены 51 здоровый доброволец (36 на антителе к Siglec-8 и 15 на плацебо), 25 субъектов с ISM, 47 субъектов с крапивницей (включая спонтанную и индуцируемую), 30 субъектов с тяжелым AC, 65

субъектов с EG/EoD, и 8 субъектов с тучноклеточным гастритом/энтеритом. В целом антитела к Siglec-8 хорошо переносятся. Наиболее частыми наблюдаемыми нежелательными явлениями, возникшими в ходе лечения, (TEAE) были реакции, связанные с инфузией (IRR), от легкой до умеренной степени, преимущественно связанные с первой инфузией, которые, как считается, связаны с активностью АЗКЦ антитела.

Также были разработаны составы антител для подкожного (п/к) введения, как описано в предыдущих примерах. Не желая быть связанными теорией, предполагается, что из-за более медленной скорости системной абсорбции антитела к Siglec-8 при подкожном введении и вероятности того, что максимальная концентрация в плазме (C_{max}) будет ниже по сравнению с дозой с сопоставимой площадью под кривой «концентрация-время» (AUC), может наблюдаться меньшая частота и тяжесть реакций, связанных с введением, по сравнению с тем, когда антитело вводится внутривенно. Исследование, описанное в данном примере, предназначено для проверки безопасности, переносимости и биодоступности подкожного введения антитела к Siglec-8, описанного в примерах 1 и 2, у здоровых добровольцев.

Подбор дозы

Предлагаемые дозы для п/к введения:

0,3 мг/кг (когорта 1);

1 мг/кг (когорта 2);

3 мг/кг (когорта 3);

5 мг/кг (когорта 4); и

300 мг (группа 8): все субъекты получают в общей сложности 2 мл (300 мг антитела к Siglec-8 или плацебо) исследуемого лекарственного средства в 1 место инъекции независимо от массы тела.

По оценкам, эти дозы обеспечивают такую же или более низкую экспозицию, чем дозы, безопасно вводимые в/в путем в различных клинических исследованиях.

Основываясь на предыдущем опыте дозирования антитела к Siglec-8 для в/в введения в качестве препарата сравнения для определения биодоступности, предлагаемые дозы антитела к Siglec-8 для в/в введения составляют:

1 мг/кг вводят в 100 мл из пакета для внутривенной инфузии, приготовленного с исследуемым лекарственным средством (группа 5);

3 мг/кг вводят в 100 мл из пакета для внутривенной инфузии, приготовленного с исследуемым лекарственным средством (группа 6); и

3 мг/кг вводят в 100 мл из пакета для внутривенной инфузии, приготовленного с исследуемым лекарственным средством (группа 7).

Дизайн исследования

Приблизительно 58 здоровых взрослых добровольцев включены в 8 когорт, включая 3 когорты по 6 субъектов в каждой, которым будут выполнять в/в введение, и 5 когорт по 8 субъектов в каждой, которым будут выполнять п/к введение (6 субъектов, получавших активный препарат, и 2 субъекта, получавших плацебо, в каждой когорте,

которых распределяли двойным слепым, рандомизированным способом).

Когорты 1, 2, 3, 4 и 8 получают однократную дозу антитела к Siglec-8 для п/к введения (0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг и 300 мг, соответственно) или плацебо. Субъекты в когортах 5, 6 и 7 получают однократную дозу антитела к Siglec-8 для в/в введения (1 мг/кг, 3 мг/кг и 3 мг/кг, соответственно). Число субъектов является типичным для фармакокинетического исследования, в котором сравнивается п/к и в/в введение моноклонального антитела.

Это двойное слепое (для когорт для п/к введения) исследование безопасности, переносимости и фармакокинетики фазы 1. Приблизительно 58 здоровых добровольцев зарегистрированы в 1-2 центрах клинических исследований в США. Сорок субъектов получают антитело к Siglec-8 для п/к введения или плацебо, а 18 субъектов получают антитело к Siglec-8 для в/в введения, как описано выше. Это исследование однократной дозы.

В 1-й день подходящие субъекты получают однократную дозу антитела к Siglec-8 (в/в или п/к) или плацебо (когорты для п/к введения) и остаются в клинике в течение 120 часов для мониторинга и наблюдения после окончания инфузии или инъекции. Образцы крови от каждого субъекта собирают для анализа концентрации антител к Siglec-8 и общего анализа крови (СВС) с подсчетом форменных элементов (включая абсолютное количество эозинофилов) в различные моменты времени во время пребывания в стационаре (до введения дозы, через 1, 3, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 и 120 часов). Субъектов выписывают из клиники на 6-й день после отбора образца крови через 120 часов. После этого субъекты возвращаются в клинику на 8-й, 15-й, 22-й, 35-й, 56-й и 85-й дни и у них отбирают образцы крови для ФД и ФК анализов.

Цели и конечные точки исследования

Основной целью исследования является оценка безопасности, переносимости и фармакокинетики состава антитела к Siglec-8 для п/к введения при введении здоровым добровольцам в виде однократной дозы.

Вторичные цели исследования: (1) оценить фармакодинамику состава антитела к Siglec-8 для п/к введения, измеряемую по изменениям относительно исходного уровня в абсолютном количестве эозинофилов в периферической крови, и (2) определить биодоступность состава антитела к Siglec-8 для п/к введения по сравнению с антителом к Siglec-8 для в/в введения путем анализа AUC.

Первичными конечными точками являются безопасность и переносимость антитела к Siglec-8, вводимого подкожно, и фармакокинетика, включая биодоступность, антитела к Siglec-8, вводимого подкожно.

Вторичными конечными точками являются оценка фармакодинамики антитела к Siglec-8 для п/к введения, измеренная по изменениям по сравнению с исходным уровнем в абсолютном количестве эозинофилов в периферической крови, и определение биодоступности состава антитела к Siglec-8 для п/к введения по сравнению с антителом к Siglec-8 для в/в введения путем анализа площади под AUC в сыворотке.

Критерии отбора пациентов

Критерии включения: Субъекты могут быть включены в исследование, если они соответствуют следующим критериям:

Мужчина или женщина в возрасте ≥ 18 и ≤ 65 лет на момент подписания формы информированного согласия;

Состояние здоровья, подтвержденное исследователем, подтверждено историей болезни, основных показателей жизненно важных функций, физикальное обследование, лабораторными исследованиями, ЭКГ и общими наблюдениями

Исследуемый продукт, доза и введение

Однократные дозы антитела к Siglec-8 для в/в введения вводят посредством периферической в/в инфузии (в течение 4 часов). Подкожное введение (антитело к Siglec-8 или плацебо) включает 1 или 2 п/к инъекции, вводимых в переднюю часть бедра с помощью иглы 27 калибра. Максимальный объем, вводимый в одно место п/к инъекции, составляет 2 мл.

Оценка безопасности, ФК и ФД

Безопасность и переносимость оценивают на протяжении всего исследования путем мониторинга и оценки нежелательных явлений, включая любые связанные с введением реакции (ARR), возникающие в результате в/в или п/к введения исследуемого лекарственного средства. Все TEAE регистрируют с начала применения исследуемого лекарственного средства до окончания исследования (EOS). Степень тяжести оценивают с использованием общей терминологии критериев нежелательных явлений Национального института рака версии 5.0 (или самой последней версии). Всем нежелательным явлениям присваивается степень тяжести, и их оценивают, чтобы определить, являются ли они клинически значимыми и связаны ли они с исследуемым лекарственным средством.

Для оценки ФД количество эозинофилов в периферической крови регистрируют, как описано в дизайне исследования.

Для оценки ФК образцы крови для фармакокинетических исследований получают до введения дозы и в различные моменты времени, указанные в дизайне исследования.

Результаты

Результаты этого исследования фазы 1 с участием здоровых добровольцев показали 63% биодоступность антитела к Siglec-8 при подкожном введении, как описано выше. Подкожное введение антитела к Siglec-8 приводило к длительному подавлению эозинофилов периферической крови, как показано на **Фиг. 9**. Например, подкожное введение в дозах 3,0 мг/кг, 5,0 мг/кг и 300 мг приводило к истощению эозинофилов в крови, идентичному таковому при внутривенных инфузиях в дозах 1,0 мг/кг и 3,0 мг/кг, причем подкожное введение в дозе 1,0 мг/кг также было идентичным во всех временных точках, кроме 85 дня.

Кроме того, лечение антителами хорошо переносилось, не было реакций в месте инъекции или реакций на инъекцию, нежелательных явлений, связанных с лечением, и серьезных нежелательных явлений, что указывает на то, что подкожное введение, как

описано выше, подходит для дозирования один раз в месяц.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Все полипептидные последовательности представлены от N-конца к C-концу, если не указано иное.

Все последовательности нуклеиновых кислот представлены от 5' до 3', если не указано иное.

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2
мышь

QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAG
GSTNYNSALMSRLSISKDNSKSKVFLKINSLQTDALYYCARDGSSPYYYSMYEWGQ
GTSVTVSS (SEQ ID NO:1)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2
RHA

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMYEW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:2)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2
RHB

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWLGVIWA
GGSTNYNSALMSRLSISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMYEW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:3)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2
RHC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMYEW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:4)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2
RHD

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWLSVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMYEW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:5)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2
RHE

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMYEW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:6)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2
RHF

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWA
GGSTNYNSALMSRLTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMYEW

GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:7)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHG

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWA
GGSTNYNSALMSRFSISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:8)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHA2

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISIIYGAHWIRQPPGKGLEWIGVIWAGG
STNYNSALMSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQG
TLVTVSS (SEQ ID NO:9)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHB2

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAG
GSTNYNSALMSRSLISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQ
GTLVTVSS (SEQ ID NO:10)

Аминокислотная последовательность мутантного переменного домена тяжелой цепи 2E2 RHE S-G

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYGMEYW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:11)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHE E-D

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMDYW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:12)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHE Y-V

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEVW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:13)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHE с тройной мутацией

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYGMDVW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:14)

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи 2E2

мышь

QIILTQSPAIMASAPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASG
VPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:15)

Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи 2E2 RKA
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASG
 IPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:16)

Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи 2E2 RKB
 EIILTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLWIYSTSNLASG
 VPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:17)

Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи 2E2 RKC
 EIILTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGI
 PARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:18)

Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи 2E2 RKD
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLWIYSTSNLAS
 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:19)

Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи 2E2 RKE
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASG
 VPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:20)

Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи 2E2 RKF
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASG
 IPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:21)

Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи 2E2 RKG
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASG
 IPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:22)

Аминокислотная последовательность мутантного вариабельного домена легкой цепи 2E2 RKA F-Y

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASG
 IPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPYTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:23)

Аминокислотная последовательность мутантного вариабельного домена легкой цепи 2E2 RKF F-Y

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASG
 IPARFSGSGSGTDYTLTISSELPEDFAVYYCQQRSSYPYTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:24)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи HEKA и тяжелой цепи HEKF
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIIWA
 GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYSMEYW
 GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
 VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:75)

Аминокислотная последовательность легкой цепи HEKA

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASG

IPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:76)

Аминокислотная последовательность легкой цепи HEKF

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASG
IPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:77)

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:78)

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG4

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:79)

Аминокислотная последовательность константной области легкой каппа-цепи Ig

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:80)

Аминокислотная последовательность мышинной тяжелой цепи 2C4 и 2E2 IgG1

QVQLKRRASGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWA
GGSTNYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKINSLQTDALYYCARDGSSPYYYSMYEWG
QGTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGV
HTFPAVLESDLYTLSSSVTPSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTV
PEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREE
QFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPK
EQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVNQ
KSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPG (SEQ ID NO:81)

Аминокислотная последовательность мышинной легкой каппа-цепи 2C4

EIILTQSPAIMASAPGEEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASG
VPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEADAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKADAAPTVSIFP
PSSEQLTSGGASVVCFLNLFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSLSSST
LTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK (SEQ ID NO:82)

Аминокислотная последовательность мышинной легкой каппа-цепи 2E2

QILTQSPAIMASAPGEEKVSITCSATSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASG
 VPVRFSGSGSGTSSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKADAAPTVSIFP
 PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSST
 LTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREC (SEQ ID NO:83)

Аминокислотная последовательность химерных тяжелых цепей 2C4 и 2E2 IgG1

QVQLKRASGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWA
 GGSTNYNSALMSRLSISKDNSKSVFLKINSLQDDTALYYCARDGSSPYYYSMEYWG
 QGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKRVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:84)

Аминокислотная последовательность химерной легкой каппа-цепи 2C4

EIILTQSPAIMASAPGEEKVSITCSATSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASG
 VPVRFSGSGSGTSSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
 TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:85)

Аминокислотная последовательность химерной легкой каппа-цепи 2E2

QILTQSPAIMASAPGEEKVSITCSATSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASG
 VPVRFSGSGSGTSSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
 TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:86)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи HEKA IgG4 (IgG4 содержит мутацию S228P)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIIWA
 GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYW
 GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVNVDHKPSNTKVKDKRVEPKYGPCCPPCP
 APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
 RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:87)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 1C3 мыши (подчеркнутые остатки включают CDR- H1 и H2 в соответствии с нумерацией Chothia)

EVQVVESGGDLVKSGLKLSAASGFPFESSYAMSWVRQTPDKRLEWVAIISSG
 GSYTYYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHETAQAAWFAYWG
 QGTLVTVSA (SEQ ID NO:106)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи мыши 1H10 (подчеркнутые остатки включают CDR- H1 и H2 в соответствии с нумерацией Chothia)

EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDYMYWVKQRPEQGLEWIGRIAPE
DGDTEYAPKFGKATVTADTSSNTAYLHLSLTSSEDTAVYYCTTEGNYYGSSILDYWG
QGTTLTVSS (SEQ ID NO:107)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 4F11 мыши (подчеркнутые остатки включают CDR- H1 и H2 в соответствии с нумерацией Chothia)

QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYAFRSSWMNWVKQRPGKGLEWIGQIYP
GDDYTNYNGKFKGKVTLTADRSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARLGPYGPFFADWGQ
GTLVTVSA (SEQ ID NO:108)

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи 1C3 мыши

QIVLTQSPAIVSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQKSGTSPKRWIYDTSKLA
YGVPARFSGSGSGTSLTISSEAEADAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID
NO:109)

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи 1H10 мыши

DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDITNYLNWYQQKPDGTVKLLIYFTSRLHS
GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID
NO:110)

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи 4F11 мыши

QIVLTQSPAIVSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQRPGSSPRLIYDTSSLASG
VPVRFSGSGSGTSLTISRIESEDAANYCQQWNSDPYTFGGGTKLEIK (

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Жидкий состав, содержащий: (а) моноклональное антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, причем антитело содержится в концентрации от около 70 мг/мл до около 210 мг/мл; и (б) гистидин или ацетат натрия в концентрации около 10 мМ до около 25 мМ;

при этом рН жидкого состава составляет от 5,0 до 6,3; и

при этом антитело содержит: (1) переменную область тяжелой цепи, содержащую: HVR-H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:61; HVR-H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:62; HVR-H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:63; и (1) переменную область легкой цепи, содержащую: HVR-L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:64; HVR-L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:65; и HVR-L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66.

2. Состав по п. 1, отличающийся тем, что антитело содержится в концентрации от около 135 мг/мл до около 165 мг/мл.

3. Состав по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что антитело содержится в концентрации около 150 мг/мл.

4. Состав по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что состав содержит L-гистидин или гидрохлорид L-гистидина в концентрации около 15 мМ.

5. Состав по п. 4, отличающийся тем, что рН жидкого состава составляет 6,0.

6. Состав по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что состав содержит ацетат натрия в концентрации около 15 мМ.

7. Состав по п. 6, отличающийся тем, что рН жидкого состава составляет от около 5,2 до около 5,8.

8. Состав по п. 7, отличающийся тем, что рН жидкого состава составляет 5,5.

9. Состав по любому из пп. 1-8, дополнительно содержащий сахарозу в концентрации от около 5% до около 9%.

10. Состав по п. 9, содержащий сахарозу в концентрации от около 5% до около 7,5%.

11. Состав по п. 10, содержащий сахарозу в концентрации около 5%.

12. Состав по любому из пп. 1-8, дополнительно содержащий трегалозу в концентрации от около 4% до около 10%.

13. Состав по п. 12, содержащий трегалозу в концентрации от около 5% до около 7,5%.

14. Состав по п. 13, содержащий трегалозу в концентрации 6,6%.

15. Состав по любому из пп. 12-14, отличающийся тем, что трегалоза представляет собой дигидрат трегалозы.

16. Состав по любому из пп. 1-15, дополнительно содержащий полисорбат-80 в концентрации от около 0,0225% до около 0,0275% (масс./об.).

17. Состав по п. 16, отличающийся тем, что полисорбат-80 содержится в концентрации около 0,025% (масс./об.).

18. Состав по п. 1, содержащий:

- (a) антитело, которое связывается с Siglec-8 человека в концентрации 150 мг/мл;
- (b) 15 мМ L-гистидина или гидрохлорида L-гистидина;
- (c) 175 мМ дигидрата трегалозы; и
- (d) 0,025% полисорбата-80 (масс./об.);

при этом рН жидкого состава составляет 6,0.

19. Состав по п. 1, содержащий:

- (a) антитело, которое связывается с Siglec-8 человека в концентрации 150 мг/мл;
- (b) 15 мМ ацетата натрия;
- (c) 175 мМ дигидрата трегалозы; и
- (d) 0,025% полисорбата-80 (масс./об.);

при этом рН жидкого состава составляет 5,5.

20. Состав по п. 1, содержащий:

- (a) антитело, которое связывается с Siglec-8 человека в концентрации 150 мг/мл;
- (b) 15 мМ L-гистидина или гидрохлорида L-гистидина;
- (c) 5% сахарозы; и
- (d) 0,025% полисорбата-80 (масс./об.);

при этом рН жидкого состава составляет 6,0.

21. Состав по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16 или 21.

22. Состав по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

23. Состав по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что антитело содержит переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

24. Состав по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что антитело содержит область Fc тяжелой цепи, включающую область Fc IgG человека.

25. Состав по п. 24, отличающийся тем, что область Fc IgG человека включает область Fc IgG1 человека.

26. Состав по п. 25, отличающийся тем, что область Fc IgG1 человека не фукозилирована.

27. Состав по п. 24, отличающийся тем, что область Fc IgG человека включает область Fc IgG4 человека.

28. Состав по п. 27, отличающийся тем, что область Fc IgG4 человека содержит аминокислотную замену S228P, причем аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, как в нумерации по Kabat.

29. Состав по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76 или 77.

30. Состав по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76.

31. Состав по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 77.

32. Состав по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что антитело было сконструировано для улучшения активности антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ).

33. Состав по любому из пп. 1-32, отличающийся тем, что по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела не фукозилированы.

34. Промышленное изделие, содержащее контейнер, содержащий состав по любому из пп. 1-33.

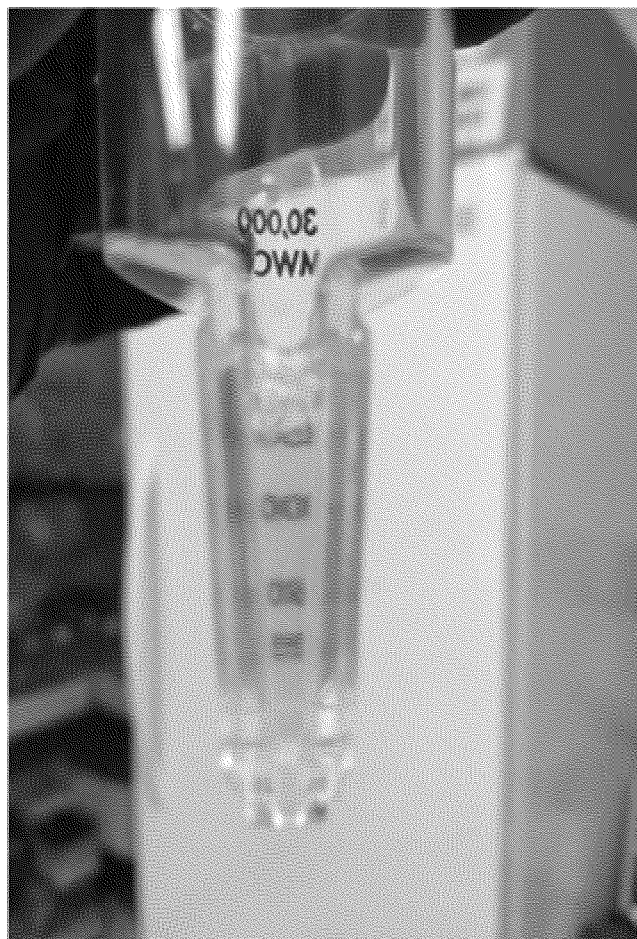
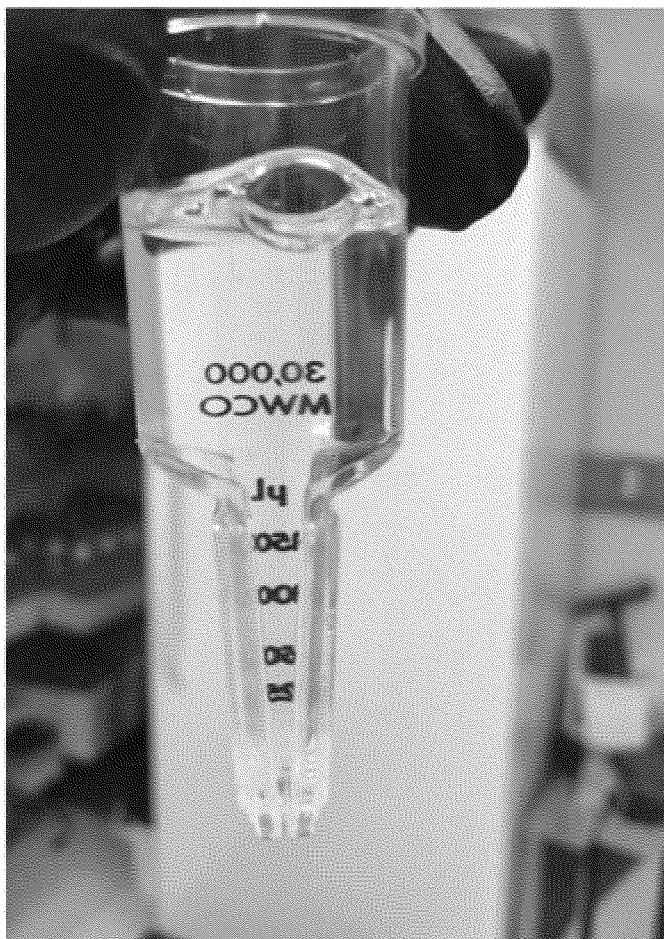
35. Промышленное изделие по п. 34, отличающееся тем, что контейнер представляет собой стеклянный флакон.

36. Промышленное изделие по п. 34 или п. 35, дополнительно содержащее инструкции по подкожному введению состава.

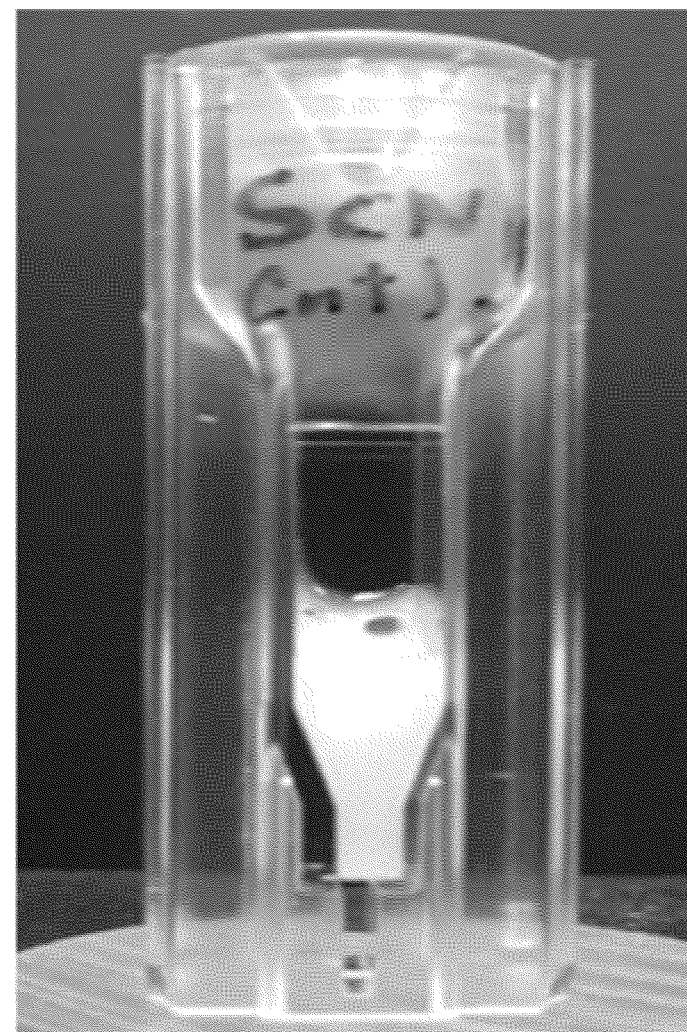
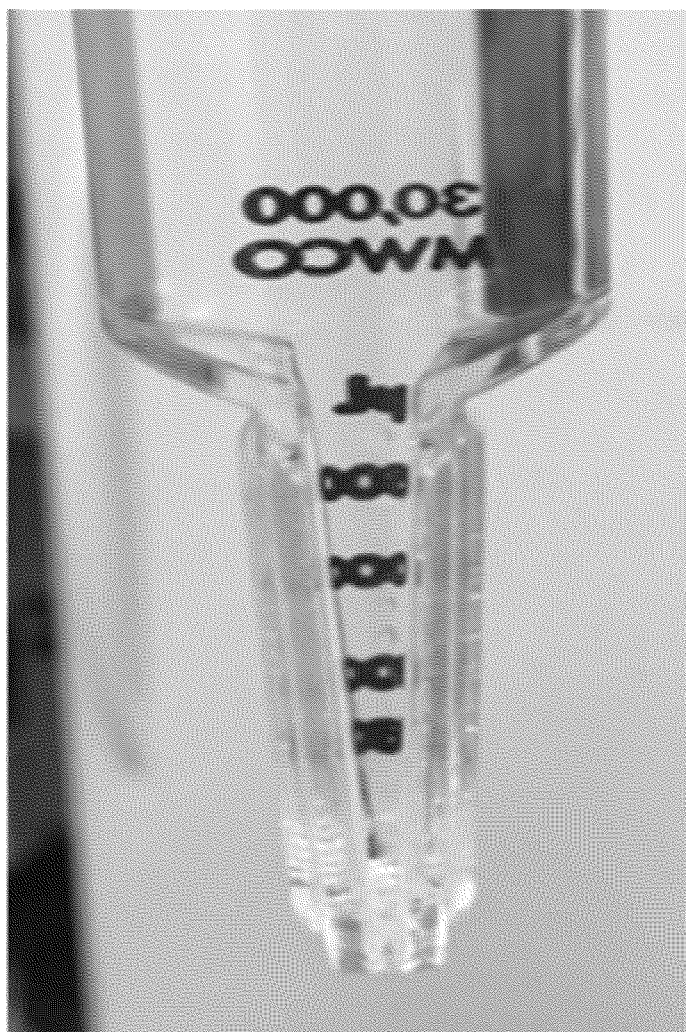
По доверенности



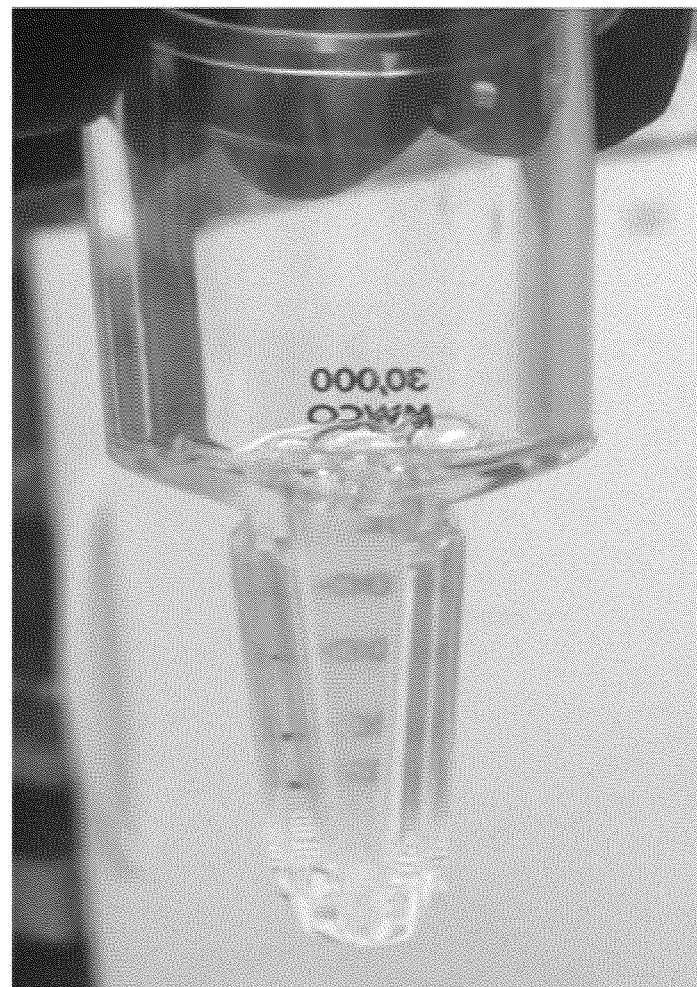
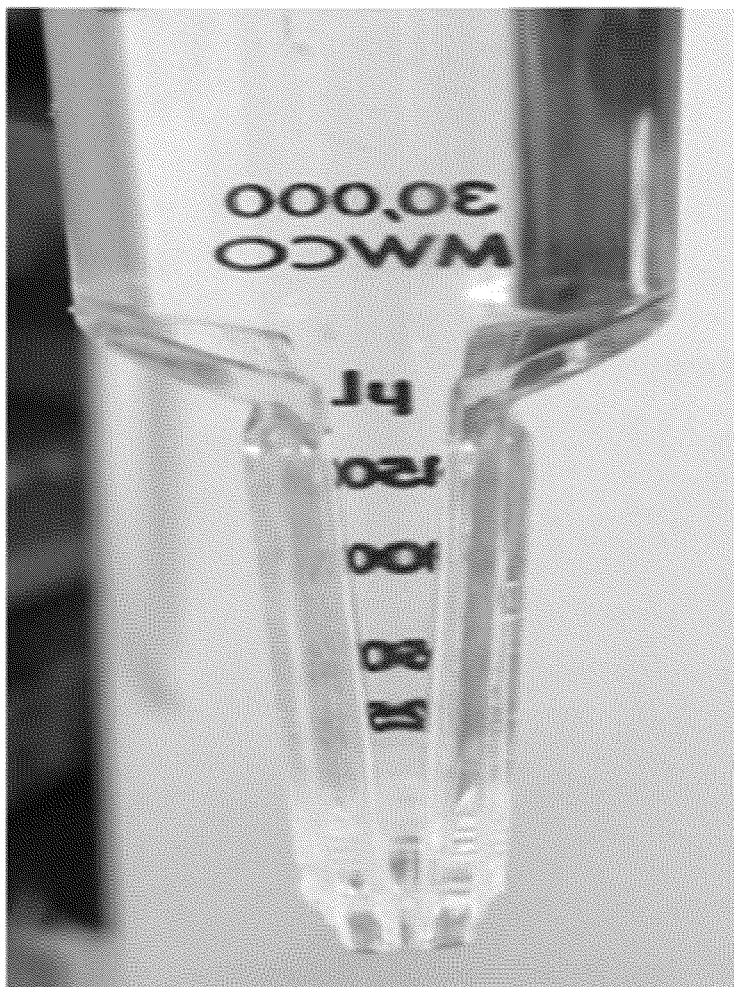
Фиг. 1



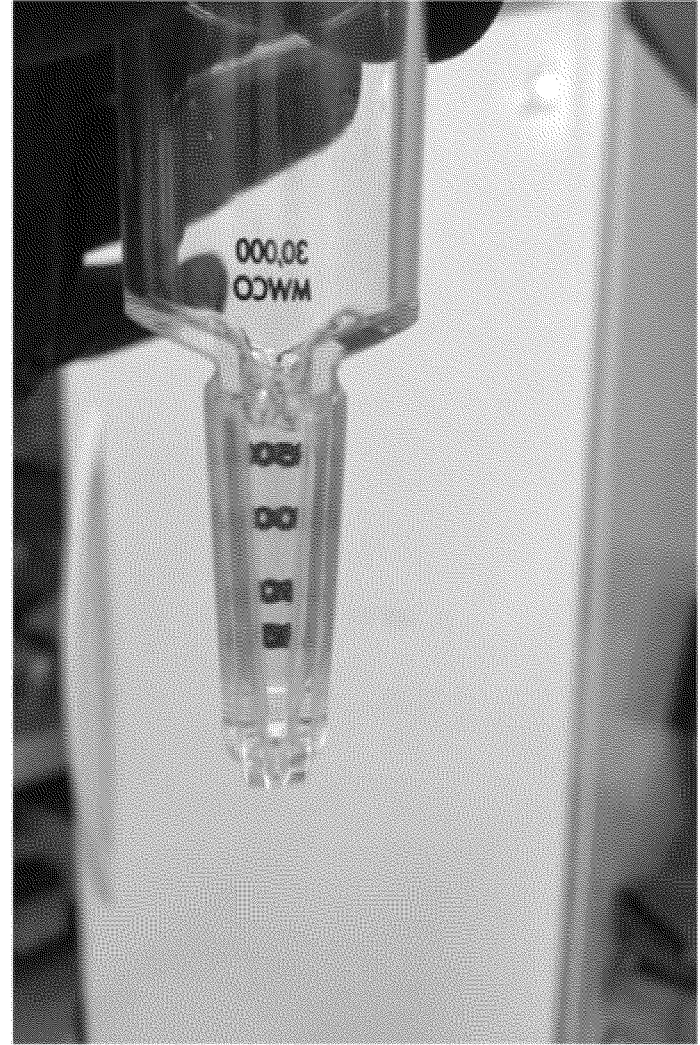
Фиг. 2



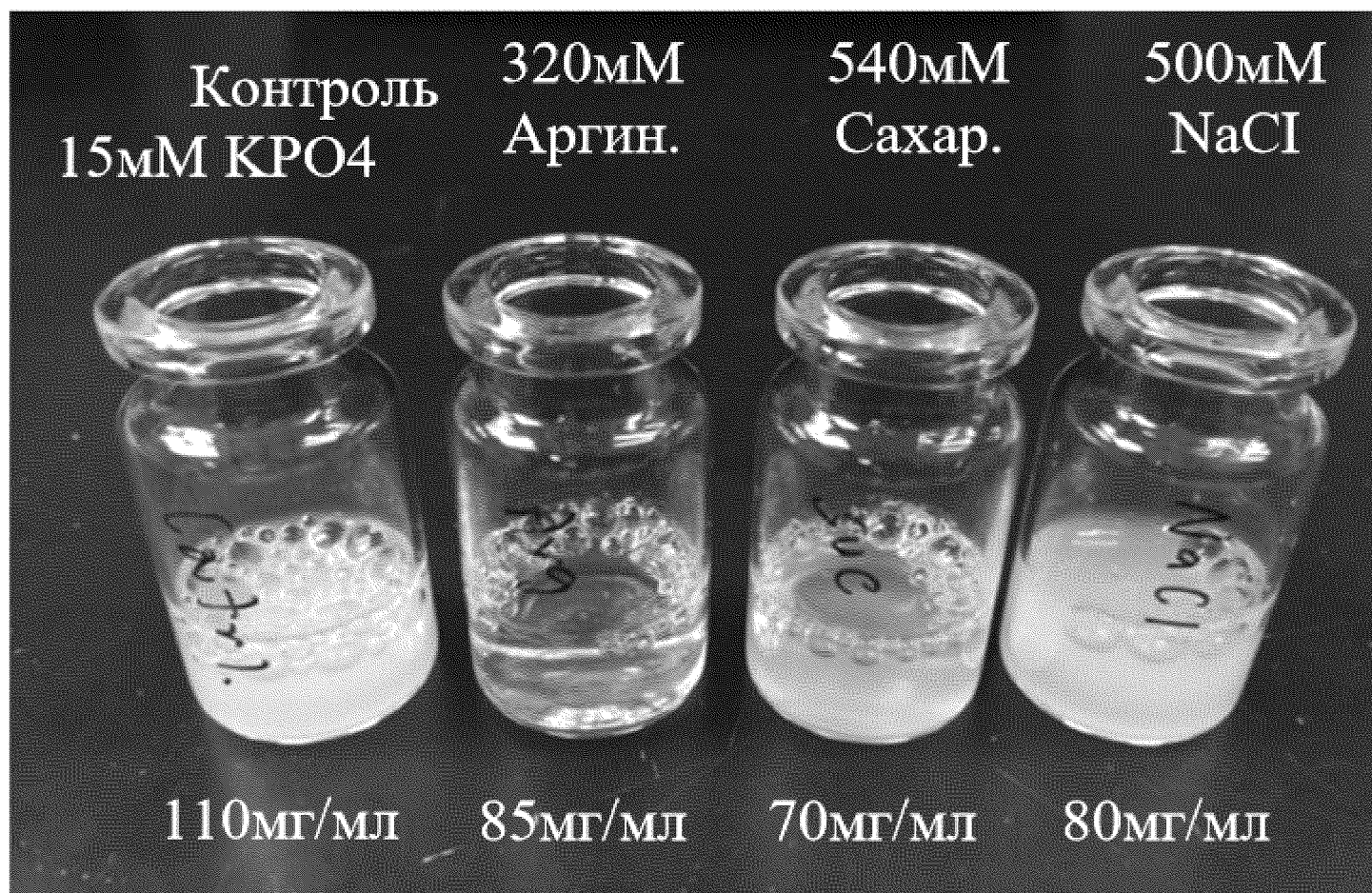
Фиг. 3



Фиг. 4

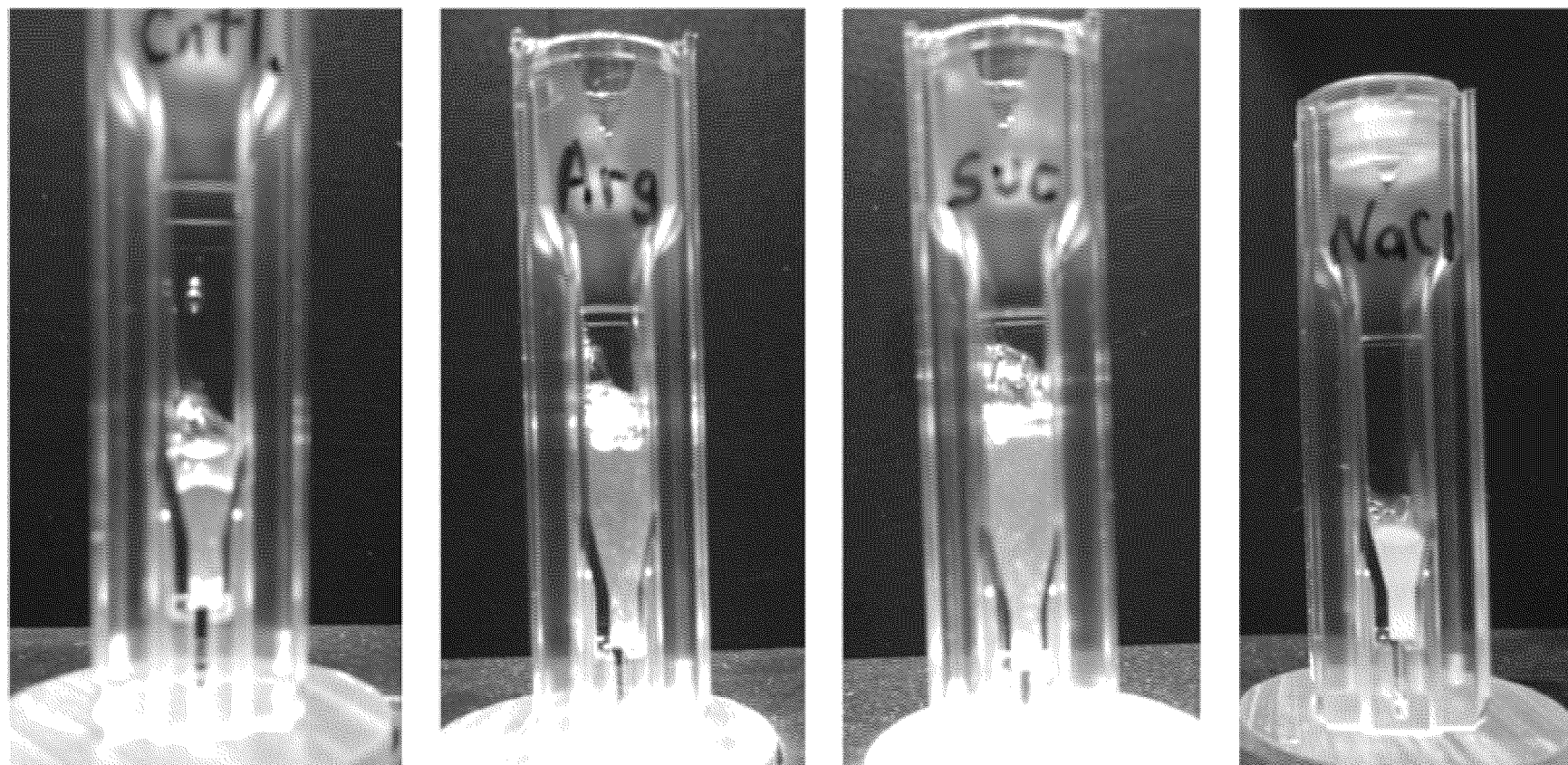


Фиг. 5

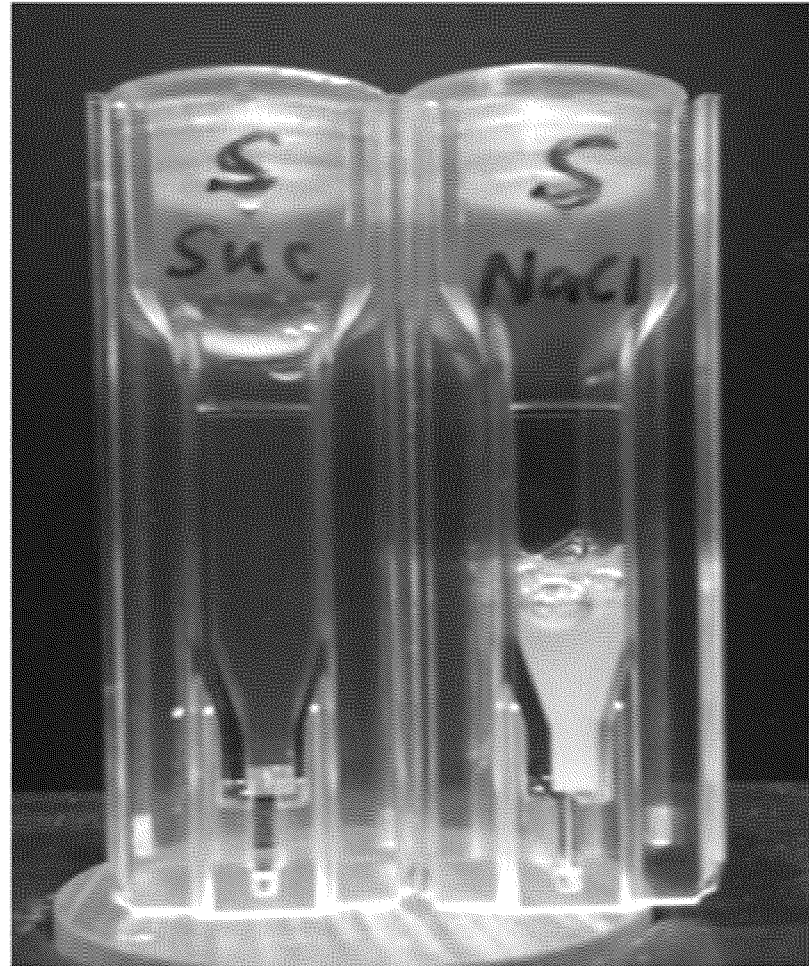


6/9

Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

Путь введения	Дозовая когорта (мг/кг)	n	Медианное кол-во эозинофилов крови, 10 ³ /мл						
			Исходный уровень	1 ч	3 ч	День 15	День 35	День 56	День 85
п/к	РВО	10	100	100	200	200	100	200	100
	0,3	6	110	200	20	0	0	50	100
	1,0	6	150	0	0	0	0	0	50
	3,0	6	150	0	0	0	0	0	0
	5,0	6	100	0	0	0	0	0	0
	300 мг	6	100	0	0	0	0	0	0
в/в	1,0	6	100	0	0	0	0	0	0
	3,0	12	100	0	0	0	0	0	0

6/6

Фиг. 9