

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046789**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.23
- (21) Номер заявки
201992625
- (22) Дата подачи заявки
2018.05.04
- (51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) **СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РАССТРОЙСТВ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА**

- (31) **62/502,480; 62/572,337**
- (32) **2017.05.05; 2017.10.13**
- (33) **US**
- (43) **2020.04.20**
- (86) **PCT/US2018/031231**
- (87) **WO 2018/204871 2018.11.08**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АЛЛАКОС ИНК. (US)
- (72) Изобретатель:
**Бebbингтон Кристофер Роберт,
Янгблад Брэдфорд Эндрю, Томасевич
Ненад, Брок Эмили К. (US)**
- (74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)
- (56) **WO-A1-2008145142
WO-A2-2010063785
WO-A1-2015089117
WO-A1-2013126834
WO-A2-2005116088
RUBINSTEIN, E. et al. "Siglec-F Inhibition
Reduces Esophageal Eosinophilia and Angiogenesis in
a Mouse Model of Eosinophilic Esophagitis", J Pediatr
Gastroenterol Nutr. 2011 October, Vol. 53, No. 4,
Pages 409-416. Pages 1-17 used for citation purposes
in ISO/ISR. Abstract; 'Discussion' starting Page 5.
SONG D J. et al. "Anti-Siglec-F antibody
inhibits oral egg allergen induced intestinal
eosinophilic inflammation in a mouse model", Clin
Immunol. 2009 April, Vol. 131, No. 1, Pages 157-169.
Pages 1-26 used for citation purposes in ISO/ISR.
Abstract; 'Discussion' Starting on Page 9; Page 2, Para.
4-5, Page 10, Para. 4.
ZIMMERMANN, N. et al. "Siglec-F antibody
administration to mice selectively reduces blood and
tissue eosinophils", Allergy, 2008 September, Vol.
63, No. 9. Pages 1156-1163. Pages 1-14 used for
citation purposes in ISO/ISR. Abstract; Page 3, Para.
4; 'Discussion' starting Page 5; Page 2, Para. 4; Page 5,
Para. 5; Page 6, Para. 1 and 4; Page 7, Para. 4.
KIWAMOTO T. et al. "Siglec-8 as a drugable
target to treat eosinophil and mast cell associated
conditions", Pharmacol Ther. 2012 September, Vol.
135, No. 3, Pages 327-336. Pages 1-22 used for citation
purposes in the ISO/ISR. Abstract; Page 9, Section 8;
Page 6, Section 6.1; Page 8, Para. 2; Page 9, Para. 2-3.
FULKERSON, P. C. et al. "Targeting
Eosinophils in Allergy, Inflammation and Beyond",
Nat Rev Drug Discov. 2013 February, Vol. 12, No.
2, Article NRD3838. Pages 1-23 used for citation
purposes in the ISO/ISR. Abstract; 'Siglec-8' on Page
7.**

- (57) Настоящее изобретение относится к способам лечения воспалительного заболевания кишечника (IBD) или эозинофильного расстройства желудочно-кишечного тракта (EGID), такого как эозинофильный эзофагит (ЕОЕ), эозинофильный гастрит (EG), эозинофильный гастроэнтерит (EGE) и эозинофильный колит (EC). В частности, настоящее изобретение относится к способам лечения IBD или EGID посредством введения антител, которые связываются с Siglec-8 человека, или композиции, содержащей указанные антитела. Настоящее изобретение также относится к изделиям или наборам, содержащим антитела, которые связываются с Siglec-8 человека, для лечения IBD или EGID.

B1**046789****046789 B1**

Ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с временной заявкой на выдачу патента США №№ 62/502480, поданной 5 мая 2017 года, и 62/572337, поданной 13 октября 2017 года, раскрытия каждого из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Представление списка последовательностей в текстовом файле ascii

Содержание следующего текстового файла ASCII полностью включено в настоящее описание посредством ссылки: машиночитаемая форма (CRF) списка последовательностей (имя файла: 701712000640SEQLIST.TXT, дата регистрации: 3 мая 2018 года, размер: 115 KB).

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способам лечения воспалительных расстройств желудочно-кишечного тракта, например, воспалительного заболевания кишечника (IBD) или эозинофильного расстройства желудочно-кишечного тракта (EGID), путем введения антител, которые связываются с Siglec-8 человека, и/или композиций, содержащих указанные антитела.

Уровень техники

Расстройства желудочно-кишечного тракта представляют собой очень проблемный и разнообразный набор заболеваний. Например, IBD, которое включает различные формы колита (например, язвенный колит) и болезнь Крона, в развитых странах поражает приблизительно 1 из 200 человек, вызывая изнурительные и пожизненные симптомы (Cleynen, I. et al. (2016) *Lancet* 387: 156-167). Только в США финансовое бремя от IBD оценивается более чем в 2,2 миллиарда долларов. EGID также представляют несколько различных расстройств, которые связаны с изнурительными и часто различными желудочно-кишечными симптомами. Например, эозинофильный эзофагит (ЭОЭ) считается одной из наиболее распространенных причин проблем с питанием у детей, и, по оценкам, он затрагивает 0,4% всех детей и взрослых в западных странах (Furuta, GT и Katzka, DA (2015) *N Engl. J. Med.* 373: 1640-1648).

Причины воспаления, которые приводят к патологиям желудочно-кишечного тракта все еще изучаются. Затрагиваемые факторы включают дисбаланс между клетками Th1/Th17 и регуляторными T-клетками, дисрегулируемый ответ слизистой оболочки на комменсальную кишечную флору, атипичные Th2-ответы и тому подобное. Тогда как некоторые типы дисфункции эозинофилов и тучных клеток связаны с желудочно-кишечными симптомами (Kiwamoto, T. et al. (2012) *Pharmacol. Ther.* 135:327-336; Sokol, H. et al. (2013) *J. Allergy Clin. Immunol.* 132:866-873), участие тучных клеток в IBD было предположено, но изучено недостаточно. Доказательства лечения IBD у людей с использованием модуляторов функции тучных клеток отсутствуют (Voeckxstaens, G. (2015) *Curr. Opin. Pharmacol.* 25:45-49).

Сохраняется потребность в новых терапевтических подходах, которые направлены на воспаление, лежащее в основе заболеваний желудочно-кишечного тракта, таких как IBD и EGID.

Все ссылки, цитируемые в настоящем описании, включая заявки на патенты, патентные публикации и научную литературу, полностью включены в настоящее описание посредством ссылки, как, если бы каждая отдельная ссылка была специально и индивидуально указана как включенная в качестве ссылки.

Сущность изобретения

Для удовлетворения этой и других потребностей настоящее изобретение относится, в частности, к способам лечения или профилактики воспалительных расстройств желудочно-кишечного тракта, например, воспалительного заболевания кишечника (IBD) или эозинофильного расстройства желудочно-кишечного тракта (EGID; включая эозинофильный эзофагит (ЕОЕ), эозинофильный гастрит (EG), эозинофильный гастроэнтерит (EGE) и эозинофильный колит (EC)). Настоящее изобретение частично основано на неожиданном открытии, что терапия антителами к Siglec-8 снижает воспаление, иммунную инфильтрацию и связанную с заболеванием патологию во многих мышиных моделях желудочно-кишечного (GI) воспаления, лежащих в основе этих расстройств.

Соответственно, некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам лечения или профилактики воспалительных расстройств желудочно-кишечного тракта у индивидуума, включающим введение индивидууму эффективного количества антитела, которое связывается с Siglec-8 человека.

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к способам лечения или профилактики воспалительных расстройств желудочно-кишечного тракта у индивидуума, включающим введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека.

В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется IBD. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется язвенный колит, коллагенозный колит, лимфоцитарный колит, болезнь Крона или неклассифицированное IBD толстой кишки (IBD-U). В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется язвенный колит от умеренного до тяжелого. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется распространение заболевания толстой кишки между приблизительно 5 см и приблизительно 40 см. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется острый язвенный колит. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется болезнь Крона подвздошной кишки, болезнь Крона толстой кишки или болезнь Крона толстой и тонкой кишки. В некоторых вариантах

осуществления перед введением антитела индивидуум не получал терапию первой линии для язвенного колита или болезни Крона. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется повышенное воспаление по меньшей мере в части желудочно-кишечного тракта по сравнению с индивидуумом без IBD или эталонным значением. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется повышенное количество тучных клеток, нейтрофилов, эозинофилов и/или лимфоцитов по меньшей мере в части желудочно-кишечного тракта по сравнению с индивидуумом без IBD или эталонным значением. В некоторых вариантах осуществления биопсия из толстой кишки индивидуума показывает повышенную проницаемость слизистой оболочки по сравнению с биопсией, полученной из толстой кишки индивидуума без IBD, или эталонным значением. В некоторых вариантах осуществления в образце мочи, полученном у индивидуума, имеются повышенные уровни одного или более из: N-метилгистамина, лейкотриенов и простагландинов по сравнению с образцом мочи, полученным у индивидуума без IBD, или эталонным значением. В некоторых вариантах осуществления в образце крови, полученном у индивидуума, имеются повышенные уровни одного или более из: IL-6, IL-8, TNF α , VEGF, PDGF и MCP-1 по сравнению с образцом крови, полученным у индивидуума без IBD, или эталонным значением. В некоторых вариантах осуществления один или более симптом (симптомов) у индивидуума с IBD уменьшаются по сравнению с базовым уровнем перед введением композиции или антитела. В некоторых вариантах осуществления одно или более из поноса, вздутия живота, тошноты, боли в животе, крови в стуле, частоты жидкого стула, абсцессов брюшной полости или таза, свищей, потери веса, усталости, лихорадки, ночной потливости и задержки роста у индивидуума уменьшаются по сравнению с базовым уровнем перед введением композиции или антитела.

В некоторых вариантах осуществления композицию или антитело вводят в комбинации с одним или более дополнительным терапевтическим средством (средствами) для лечения или профилактики IBD. В некоторых вариантах осуществления одно или более дополнительное терапевтическое средство (средства) для лечения или профилактики IBD выбирают из группы, состоящей из сульфасалазина, азатиоприна, меркаптопурина, циклоспорина, кортикостероида, инфликсимаба, адалимумаба, этролизумаба, голимумаба, метотрексата, натализумаба, ведолизумаба, устекинумаба, цертолизумаб пэгола и антибиотика. В некоторых вариантах осуществления перед введением антитела индивидуума подвергают хирургическому вмешательству для лечения IBD.

В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется эозинофильное расстройство желудочно-кишечного тракта (EGID). В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется эозинофильный эзофагит (ЕОЕ). В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется эозинофильный гастрит (EG). В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется эозинофильный гастроэнтерит (EGE). В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеются EGE и EG. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется эозинофильный колит (EC). В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется повышенная эозинофильная инфильтрация по меньшей мере в части желудочно-кишечного тракта по сравнению с индивидуумом без EGID или эталонным значением. В некоторых вариантах осуществления образец, полученный из желудочно-кишечного тракта индивидуума, имеет 15 или более эозинофилов в поле зрения при большом увеличении (HPF). В некоторых вариантах осуществления образец, полученный из желудочно-кишечного тракта индивидуума, имеет в среднем 15 или более эозинофилов в поле зрения при большом увеличении (HPF) в двух или более HPF. В некоторых вариантах осуществления образец, полученный из желудочно-кишечного тракта индивидуума, имеет пиковое количество эозинофилов 50 или более эозинофилов в поле зрения при большом увеличении (HPF) в двух или более HPF. В некоторых вариантах осуществления в образце периферической крови, полученном у индивидуума, имеются 200 или более эозинофилов на мкл. В некоторых вариантах осуществления один или более симптом (симптомов) у индивидуума с EGID уменьшаются по сравнению с базовым уровнем перед введением антитела. В некоторых вариантах осуществления одно или более из боли в животе, дисфагии, затрудненного прохождения пищи, рвоты, изжоги, тошноты, отсутствия прибавки в весе, проблем с питанием, диспепсии, потери веса, поноса, желудочно-кишечной непроходимости, желудочно-кишечного кровотечения, асцита, мальабсорбции, анемии, энтеропатии с потерей белка, утолщения толстой кишки и непроходимости толстой кишки у индивидуума уменьшаются по сравнению с базовым уровнем перед введением антитела. В некоторых вариантах осуществления эозинофилия периферической крови у индивидуума уменьшается по сравнению с базовым уровнем перед введением композиции или антитела (например, антитела к Siglec-8, в котором по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела не фукозилированы, как описано в настоящем описании).

В некоторых вариантах осуществления любого из приведенных выше вариантов осуществления образец берут из биопсии желудка. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется эозинофилия периферической крови. В некоторых вариантах осуществления образец (например, из биопсии желудка), полученный из желудочно-кишечного тракта индивидуума, имеет по меньшей мере пять измерений в поле зрения при большом увеличении (HPF), в каждом из которых имеется количество эозинофилов, равное 30 или более эозинофилов на HPF. В некоторых вариантах осуществления в каждом из по меньшей мере пяти образцов, полученных из желудочно-кишечного тракта индивидуума, имеется коли-

чество эозинофилов, равное 30 или более эозинофилов в поле зрения при большом увеличении (HPF). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере пять образцов берут из биопсии желудка. В некоторых вариантах осуществления в образце периферической крови, полученном у индивидуума, экспрессия CCL2 увеличена по сравнению с эталонным значением. В некоторых вариантах осуществления количество эозинофилов в поле зрения при большом увеличении (HPF) в образце, полученном из желудочно-кишечного тракта индивидуума, уменьшается по сравнению с базовым уровнем перед введением композиции. В некоторых вариантах осуществления образец берут из биопсии желудка. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется повышенное количество тучных клеток, нейтрофилов, эозинофилов и/или лимфоцитов по меньшей мере в части желудочно-кишечного тракта по сравнению с индивидуумом без EGID.

Другие аспекты настоящего раскрытия относятся к способам лечения или профилактики эозинофильного расстройства желудочно-кишечного тракта (EGID) у индивидуума, включающим: (a) измерение экспрессии CCL2 в образце периферической крови, полученном у индивидуума; и (b) введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, если экспрессия CCL2 в образце периферической крови выше эталонного значения. Другие аспекты настоящего раскрытия относятся к способам отбора индивидуума для лечения композицией, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, причем способы включают: (a) измерение экспрессии CCL2 в образце периферической крови, полученном у индивидуума; и (b) отбор индивидуума для лечения эффективным количеством композиции, если экспрессия CCL2 в образце периферической крови выше эталонного значения. Другие аспекты настоящего изобретения относятся к способам анализа активности и/или фармакодинамики лечения индивидуума антителами к Siglec-8, причем способы включают: (a) введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека; и (b) измерение экспрессии CCL2 в образце периферической крови, полученном у индивидуума, в котором уменьшение экспрессии CCL2 по сравнению с базовым уровнем перед введением композиции показывает активность и/или фармакодинамику лечения антителами к Siglec-8. В некоторых вариантах осуществления индивидуумом является человек.

В некоторых вариантах осуществления композицию или антитело вводят в комбинации с одним или более дополнительным терапевтическим средством (средствами) для лечения или профилактики EGID. В некоторых вариантах осуществления одно или более дополнительное терапевтическое средство (средства) для лечения или профилактики EGID выбирают из группы, состоящей из кортикостероида, ингибитора лейкотриена, антигистамина, хромогликата натрия, ингибитора протонной помпы (PPI) и сульфасалазина.

В некоторых вариантах осуществления любого из приведенных выше вариантов осуществления композицию или антитело вводят путем внутривенной инфузии. В некоторых вариантах осуществления любого из приведенных выше вариантов осуществления композицию или антитело вводят путем подкожной инъекции или инфузии.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании (например, выше), антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и/или при этом вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 16 или 21. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит Fc-область тяжелой цепи, представляющую собой Fc-область человеческого IgG. В некоторых вариантах осуществления Fc-область человеческого IgG представляет собой человеческий IgG1. В некоторых вариантах осуществления Fc-область человеческого IgG представляет собой человеческий IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 76 или 77. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61 (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 67-70; и/или при этом вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 11-14; и/или вариабельную область легкой цепи, со-

NO: 99 (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106; и/или варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109; варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; и/или варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110; или варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108; и/или варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антителом является IgG1 антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело сконструировано для улучшения антитело-зависимой опосредованной клетками цитотоксической (ADCC) активности. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая улучшает ADCC активность. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела не фукозилированы. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой фрагмент антитела, выбираемый из группы, состоящей из Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')₂-фрагментов.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем описании (например, выше), антитело содержит Fc-область и N-гликозид-связанные углеводные цепи, связанные с Fc-областью, причем менее чем 50% N-гликозид-связанных углеводных цепей антитела в композиции содержат фукозный остаток. В некоторых вариантах осуществления по существу ни одна из N-гликозид-связанных углеводных цепей антитела в композиции не содержит фукозный остаток. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 не являющегося человеком примата. В некоторых вариантах осуществления не являющимся человеком приматом является павиан. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом в домене 1 Siglec-8 человека, причем домен 1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом в домене 3 Siglec-8 человека, причем домен 3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело 4F11. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом в домене 2 или домене 3 Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления домен 2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело 1C3. В некоторых вариантах осуществления домен 3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело 1H10. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом в домене 1 Siglec-8 человека и конкурирует с антителом 4F11 за связывание с Siglec-8. В некоторых вариантах осуществления антитело не конкурирует с антителом 2E2 за связывание с Siglec-8. В некоторых вариантах осуществления антитело не является антителом 2E2. В некоторых вариантах осуществления домен 1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит Fc-область тяжелой цепи, представляющую собой Fc-область человеческого IgG. В некоторых вариантах осуществления Fc-область человеческого IgG представляет собой Fc-область человеческого IgG1. В некоторых вариантах осуществления Fc-область человеческого IgG1 не фукозилирована. В некоторых вариантах осуществления Fc-область человеческого IgG представляет собой Fc-область человеческого IgG4. В некоторых вариантах осуществления Fc-область человеческого IgG4 содержит аминокислотную замену S228P, причем аминокислотные остатки нумеруют в соответствии с индексом ЕС согласно Kabat.

В некоторых вариантах осуществления антитело истощает эозинофилы крови и/или ингибирует активацию тучных клеток.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем изобретении (например, выше), индивидуумом является человек. В некоторых вариантах осуществления антитело находится в композиции (например, фармацевтической композиции), содержащей антитело и фармацевтически приемлемый носитель.

Другие аспекты настоящего раскрытия относятся к готовому изделию, содержащему лекарственное средство, содержащее антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, и вкладыш в упаковке, содержащий инструкции для введения лекарственного средства нуждающемуся в этом индивидууму в соответствии с любым из приведенных выше вариантов осуществления.

Следует понимать, что одно, некоторые или все свойства разных вариантов осуществления, описанных в настоящем изобретении, могут быть скомбинированы для образования других вариантов осуществления настоящего раскрытия. Эти и другие аспекты настоящего раскрытия будут понятны специалисту в данной области. Эти и другие варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно описаны посредством подробного описания, которое следует ниже.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1А представлено схематичное изображение исследования, в котором изучают влияние лечения антителами к Siglec-8 на индуцированную натриевой солью сульфата декстрана (DSS) мышиную модель IBD.

На фиг. 1В показано, что лечение антителами к Siglec-8 предотвращает индуцированную DSS потерю веса. Процентное изменение массы тела по сравнению с 0 днем показано для мышей, получавших обычную питьевую воду (кружки) или получавших без ограничения 3,5% DSS в течение 5 дней, с последующей обычной питьевой водой в течение 4 дней, в соответствии с временной шкалой, показанной на фиг. 1А. Мышей, получавших 3,5% DSS, лечили одной внутрибрюшинной (IP) дозой моноклонального антитела к Siglec-8 (треугольники) или антителом изотипического контроля (квадраты), начиная со 2 дня. * $p < 0,05$ изотипический контроль по сравнению с обычной водой; # $p < 0,05$ изотип по сравнению с антителом против Siglec-8. Статистические данные получали с использованием непарного двустороннего критерия Стьюдента; групповые средние обозначены \pm SEM.

На фиг. 2 показано, что лечение антителами к Siglec-8 улучшает индекс активности заболевания (DAI) в индуцированной DSS мышиную модели IBD. Тестовые группы и режим лечения были такими, как описано выше со ссылкой на фиг. 1А & 1В. Потерю веса, консистенцию стула и видимую кровь в кале оценивали по шкале 0-4 по степени тяжести вышеупомянутых категорий. * $p < 0,05$ изотипический контроль по сравнению с обычной водой; # $p < 0,05$ изотип по сравнению с антителом против Siglec-8. Статистические данные получали с использованием непарного двустороннего критерия Стьюдента; групповые средние обозначены \pm SEM.

На фиг. 3 показано, что лечение антителами к Siglec-8 значительно уменьшало увеличение массы толстой кишки в индуцированной DSS мышиную модели IBD. Тестовые группы и режим лечения были такими, как описано выше со ссылкой на фиг. 1А & 1В. Статистические данные получали с использованием критерия Манна-Уитни; массу толстой кишки у отдельных животных обозначали \pm SD. Массу толстой кишки измеряли на 9 день в конце исследования.

На фиг. 4 показано, что лечение антителами к Siglec-8 уменьшало инфильтрацию иммунных клеток в индуцированной DSS мышиную модели IBD. Тестовые группы и режим лечения были такими, как описано выше со ссылкой на фиг. 1А & 1В. На 5 день после воздействия DSS мышей анализировали на предмет инфильтрации иммунных клеток в собственную пластинку толстой кишки с использованием проточной цитометрии. Стратегии гейтирования иммунных клеток для проточной цитометрии следующие: нейтрофилы (CD45+ 7AAD- Ly6G+ CD11b+); рекрутированные моноциты (CD45+ 7AAD-CD11b+ Ly6G- F480+ Ly6C+); и резидентные макрофаги (CD45+ 7AAD- CD11b+ Ly6G-F480+ Ly6C-). Статистические данные получали с использованием критерия Манна-Уитни. Отдельных животных обозначали как % жизнеспособных лейкоцитов CD45+ \pm SD.

На фиг. 5А представлено схематичное изображение исследования, в котором изучают влияние лечения антителами к Siglec-8 на мышиную модель эозинофильного гастроэнтерита (EGE).

На фиг. 5В представлено влияние лечения антителами к Siglec-8 на эозинофилы крови, эозинофилы ткани в тонкой кишке и тучные клетки ткани в тонкой кишке в мышиную модель EGE. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; статистические данные получали использование критерия Манна-Уитни. Групповые средние обозначены \pm SEM (n=6-7 мышей/группу). Стратегии гейтирования иммунных клеток для проточной цитометрии следующие: эозинофилы (CD45+ 7AAD- Ly6G- CD11b+ Siglec-F+); тучные клетки (CD45+ 7AAD- CD117+ IgER+).

На фиг. 6А представлен дизайн исследования для тестирования активности против Siglec-8 в мышиную модель эозинофильного гастрита (EG) и гастроэнтерита (EGE).

На фиг. 6В представлена стратегия гейтирования с помощью проточной цитометрии в ткани желудка для эозинофилов. Эозинофилы гeyтировали в виде CD45+ 7AAD- Lin-(CD3, CD4, CD8, CD19, TER119, CD5) Ly6G- CD11b+ Siglec-F+ CCR3+. Эозинофилы в ткани желудка окрашивались положительно на Siglec-8 по сравнению с флуоресценцией с комбинацией детектируемых меток без одной (FMO), на что указывают стрелки.

На фиг. 6С представлена стратегия гейтирования с помощью проточной цитометрии в ткани желудка для тучных клеток. Тучные клетки гeyтировали в виде CD45+ 7AAD- Lin-, CD117+ IgER^{Mid}. Тучные клетки в ткани желудка окрашивались положительно на Siglec-8 по сравнению с флуоресценцией с комбинацией детектируемых меток без одной (FMO), на что указывают стрелки.

На фиг. 7А & 7В представлено количественное определение эозинофилов с помощью проточной цитометрии в желудке (на фиг. 7А) и тонкой кишке (на фиг. 7В) при завершении исследования на 39 день. * $p < 0,05$ n=6-8 мышей/группа.

На фиг. 8 представлены графики проточной цитометрии эозинофилов в брыжеечных лимфатических узлах (MLN) у мышей в контроле с имитацией, OVA+изотипический контроль или при лечении OVA+антителом против Siglec-8.

На фиг. 9А & 9В представлено количественное определение эозинофилов с помощью проточной цитометрии в MLN (на фиг. 9А) и крови (на фиг. 9В) при завершении исследования на 39 день. * $p < 0,05$

** $p < 0,01$ $n = 6-8$ мышей/группа.

На фиг. 10 представлены графики проточной цитометрии тучных клеток в желудке у мышей в контроле с имитацией, OVA+изотипический контроль или при лечении OVA+антитело против Siglec-8.

На фиг. 11A-11C представлено количественное определение тучных клеток с помощью проточной цитометрии в желудке (на фиг. 11A), тонкой кишке (на фиг. 11B) и MLN (на фиг. 11C) при завершении исследования на 39 день. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ $n = 6-8$ мышей/группа.

На фиг. 12A-12E представлен анализ экспрессии гена с помощью qPCR медиаторов воспаления, вовлеченных в рекрутинг эозинофилов и тучных клеток в ткани тонкой кишки. Показаны экспрессия MCPT1 (на фиг. 12A), MBP (на фиг. 12B), CCL5 (на фиг. 12C), CCL2 (на фиг. 12D) и CCL17 (на фиг. 12E). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ $n = 6-8$ мышей/группа. Сокращение: MCPT1: протеаза-1 тучных клеток; MBP: главный щелочной белок; CCL: хемокин (с-с мотив) лиганд.

На фиг. 13A-13C представлена концентрация CCL2 (на фиг. 13A), CXCL1/КС (на фиг. 13B) и OVA-IgE (на фиг. 13C) в сыворотке контрольных и получивших лечение OVA мышей при завершении исследования на 39 день. * $p < 0,05$ $n = 6-8$ мышей/группа. Сокращение: CCL2: хемокин (с-с мотив) лиганд-2; CXCL1: хемокин (с-х-с мотив)-1.

Подробное описание

I. Определения.

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными композициями или биологическими системами, которые могут, конечно, варьировать. Также следует понимать, что используемая в настоящем описании терминология предназначена для цели описания только конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения. В рамках описания и приложенной формулы изобретения, формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если в содержании четко не указано иное. Таким образом, например, ссылка на "молекулу" необязательно включает комбинацию двух или более таких молекул и тому подобное.

В рамках настоящего изобретения термин "приблизительно" относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, хорошо известному специалисту в данной области техники. Ссылка на "приблизительное" значение или параметр в настоящем описании включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на это значение или параметр как таковые.

Следует понимать, что аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения включают "содержащий", "состоящий" и "по существу состоящий из" аспектов и вариантов осуществления.

Термин "антитело" включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (включая полноразмерные антитела, которые имеют Fc-область 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). В настоящем описании термин "иммуноглобулин" (Ig) используют взаимозаменяемо с "антителом".

Основное звено антитела с 4 цепями представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. IgM антитело состоит из 5 основных звеньев гетеротетрамера наряду с дополнительным полипептидом, называемым J цепь, и содержит 10 антигенсвязывающих участков, тогда как IgA антитела состоит из 2-5 основных звеньев с 4 цепями, которые могут полимеризоваться с образованием поливалентных групп в комбинации с J цепью. В случае IgG, звено с 4 цепями обычно составляет приблизительно 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 изотипа H цепи. Каждая H и L цепь также имеет разделенные равными промежутками дисульфидные мостики внутри цепи. Каждая H цепь имеет на N-конце вариабельный домен (V_H), за которыми следуют три константных домена (C_H) для каждой из α и γ цепей и четыре C_H домена для изотипов μ и ϵ . Каждая L цепь имеет на N-конце вариабельный домен (V_L), за которым следует константный домен на другом его конце. V_L выровнен с V_H, а C_L выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи (C_{H1}). Считается, что границу между вариабельными доменами легкой цепи и тяжелой цепи образуют конкретные аминокислотные остатки. Образование пары из V_H и V_L образует один антигенсвязывающий участок. Для структуры и свойств разных классов антител, см., например, Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Tarr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6.

L цепь любого вида позвоночных можно отнести к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа и лямбда, на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (CH) иммуноглобулины можно отнести к разным классам или изотипам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющих тяжелые цепи, обозначенные α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Классы γ и α дополнительно делят на подклассы на основе относительно незначительных отличий в последовательности и функции CH, например, у людей экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. IgG1 антитела могут существовать во множестве полиморфных вариантов, называемых аллотипы (рассмотрено у Jefferis и Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4 1-7), любой из кото-

рых подходит для использования в настоящем изобретении. Распространенными аллотипическими вариантами в человеческих популяциях являются популяции, обозначаемые буквами a, f, n, z.

"Выделенным" антителом является антитело, которое было идентифицировано, отделено и/или извлечено из компонента среды его возникновения (например, в природе или рекомбинантно). В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид не содержит связи со всеми другими компонентами из среды его возникновения. Загрязняющие компоненты среды его возникновения, такие как компоненты, полученные из рекомбинантных трансфицированных клеток, представляют собой материалы, которые обычно являются помехами в исследовательских, диагностических или терапевтических вариантах применения антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В некоторых вариантах осуществления полипептид очищают: (1) до более чем 95% по массе антитела, что определяют с помощью, например, метода Лоури, а в некоторых вариантах осуществления до более чем 99% по массе; (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности путем использования секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности с помощью SDS-PAGE в невосстанавливающих или восстанавливающих условиях с использованием красителя кумасси синий или серебряный. Выделенное антитело включает антитело *in situ* внутри рекомбинантных клеток, поскольку по меньшей мере один компонент естественной окружающей среды антитела не будет присутствовать. Обычно, однако, выделенный полипептид или антитело получают с помощью по меньшей мере одной стадии очистки.

Термин "моноклональное антитело" в рамках настоящего изобретения относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными за исключением возможных существующих в природе мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризаций, амидирований), которые могут присутствовать в незначительных количествах. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела имеют C-концевое расщепление в тяжелой цепи и/или легкой цепи. Например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков расщепляют на C-конце тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления C-концевое расщепление удаляет из тяжелой цепи C-концевой лизин. 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 расщепляют на N-конце тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела являются очень специфическими, направленными против одного антигенного участка. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела являются очень специфическими, направленными против множества антигенных участков (такие как биспецифическое антитело или полиспецифическое антитело). Определение "моноклональное" показывает характер антитела, полученного из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать в качестве необходимости получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, подлежащие применению согласно настоящему изобретению, можно получить с помощью множества методик, включая, например, гибридомный способ, способы рекомбинантной ДНК, технологии фагового дисплея и технологии получения человеческих или человекоподобных антител у животных, которые имеют части или все локусы человеческого иммуноглобулина или гены, кодирующие последовательности иммуноглобулина человека.

Термин "голое антитело" относится к антителу, которое не конъюгировано с цитотоксическим фрагментом или радиоизотопной меткой.

Термины "полноразмерное антитело", "интактное антитело" или "полное антитело" используют взаимозаменяемо для ссылки на антитело в его по существу интактной форме, в отличие от фрагмента антитела. Специфически полные антитела включают антитела с тяжелыми и легкими цепями, включая Fc-область. Константными доменами могут быть константные домены с нативными последовательностями (например, константные домены с нативными последовательностями человека) или с вариантами их аминокислотных последовательностей. В некоторых случаях интактное антитело может иметь одну или более эффекторных функций.

"Фрагмент антитела" содержит часть интактного антитела, антигенсвязывающую и/или переменную область интактного антитела. Примеры фрагментов антитела включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv-фрагменты; диатела; линейные антитела (см. патент США № 5641870, пример 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); молекулы одноцепочечного антитела и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антитела.

В результате расщепления антител папаином получают два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых "Fab"-фрагменты, и остаточный "Fc"-фрагмент, обозначение, отражающее способность легкой кристаллизации. Fab-фрагмент состоит из полной L цепи наряду с доменом переменной области H цепи (V_H) и первым константным доменом одной тяжелой цепи (C_{H1}). Каждый Fab-фрагмент является моновалентным в отношении связывания антигена, т.е. он имеет один антигенсвязывающий участок. Обработка антитела пепсином дает один большой F(ab')₂-фрагмент, который приблизительно соответствует двум связанным дисульфидом Fab-фрагментам, имеющим разную антигенсвязывающую активность, и все-таки способен перекрестно связывать антиген. Fab'-фрагменты отличаются от

Fab-фрагментов наличием нескольких дополнительных остатков на карбокси конце C_{H1} домена, включая один или более цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH является обозначением в настоящем описании для Fab', в котором цистеиновый остаток (остатки) константных доменов несут свободную тиоловую группу. F(ab')₂-фрагменты антител первоначально были получены в виде пар Fab'-фрагментов, которые имеют между ними шарнирные цистеины. Также известны другие химические соединения фрагментов антитела.

Fc-фрагмент содержит карбокси-концевые части обеих H цепей, удерживаемых вместе дисульфидами. Эффекторные функции антител определяются последовательностями в Fc-области, области, которую также распознают Fc-рецепторы (FcR), находящиеся на некоторых типах клеток.

"Fv" представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный распознающий и связывающий антиген участок. Данный фрагмент состоит из димера домена варибельной области одной тяжелой и одной легкой цепи с тесной, нековалентной связью. В результате складывания этих двух доменов образуется шесть гиперварибельных петель (по 3 петли, каждая из H и L цепи), которые дают аминокислотные остатки для связывания антигена и придают антителу антигенсвязывающую специфичность. Однако, даже один варибельный домен (или половина Fv, содержащая только три HVR, специфических к антигену) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя с более низкой аффинностью, чем целый участок связывания.

"Однопочечные Fv", также сокращенно называемые "sFv" или "scFv", представляют собой фрагменты антител, которые содержат домены V_H и V_L антитела, соединенные в одну полипептидную цепь. В некоторых вариантах осуществления sFv полипептид дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L, который обеспечивает sFv для образования нужной структуры для связывания антигена. Для обзора sFv, см. Pluckthun *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg и Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

"Функциональные фрагменты" антител согласно настоящему изобретению содержат часть интактного антитела, обычно содержащую антигенсвязывающую или варибельную область интактного антитела или Fv-область антитела, которая сохраняет или обладает модифицированной способностью связывания FcR. Примеры фрагментов антитела включают молекулы линейных антител, однопочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Моноклональные антитела в настоящем описании специфически включают "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител, полученных из конкретного вида или относящихся к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи (цепей) идентична (идентичны) или гомологичны соответствующим последовательностям антител, полученных из другого вида или относящихся к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии, что они демонстрируют нужную биологическую активность (патент США № 4816567; Morrison et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Интересующие химерные антитела в рамках настоящего изобретения включают антитела PRIMATIZED®, у которых антигенсвязывающая область антитела получена из антитела, полученного, например, посредством иммунизации макака интересующим антигеном. В рамках изобретения "гуманизированное антитело" используют в качестве подмножества "химерных антител".

"Гуманизированные" формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. В одном варианте осуществления гуманизированным антителом является человеческий иммуноглобулин (реципиентное антитело), в котором остатки из HVR реципиента заменены остатками из HVR не являющегося человеком вида (донорское антитело), такого как мышь, крыса, кролик или нечеловеческий примат, обладающий нужной специфичностью, аффинностью и/или способностью. В некоторых случаях остатки FR человеческого иммуноглобулина заменяют соответствующими нечеловеческими остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаружены в реципиентном антителе или в донорском антителе. Эти модификации можно получить для дополнительного улучшения эффективности антитела, такой как аффинность связывания. В общем, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух варибельных доменов, причем все или по существу все гиперварибельные петли соответствуют петлям последовательности нечеловеческого иммуноглобулина, а все или по существу все FR-области представляют собой области последовательности нечеловеческого иммуноглобулина, хотя FR-области могут содержать одну или более замен отдельных остатков FR, которые улучшают эффективность антитела, такую как аффинность связывания, изомеризацию, иммуногенность и т.д. В некоторых вариантах осуществления количество этих аминокислотных замен в FR составляет не более 6 в H цепи, а в L цепи не более 3. Гуманизированное антитело необязательно будет также содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно константной области человеческого иммуноглобулина. Для дополнительных подробностей, 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 и Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlе и Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); и патенты США №№ 6982321 и 7087409.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела направлены против одного антигенного участка. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела направлены против множества антигенных участков. Альтернативный способ гуманизации описан в патенте США № 7981843 и публикации заявки на выдачу патента США № 2006/0134098.

"Вариабельная область" или "вариабельный домен" антитела относится к аминоконцевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи могут называться "V_H" и "V_L", соответственно. Эти домены обычно являются наиболее вариабельными частями антитела (относительно других антител того же класса) и содержат антигенсвязывающие участки.

Термин "гипервариабельная область", "HVR" или "HV" при использовании в настоящем описании относится к областям вариабельного домена антитела, которые являются гипервариабельными по последовательности и/или образуют структурно определенные петли. Обычно, антитела содержат шесть HVR; три в V_H (H1, H2, H3) и три в V_L (L1, L2, L3). В нативных антителах H3 и L3 демонстрируют наибольшее разнообразие шести HVR, и полагают, что H3 в частности играет уникальную роль в придании антителам точной специфичности. См., например, Xu et al. *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson и Wu в *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed. Human Press, Totowa, NJ, 2003)). На самом деле, существующие в природе верблужьи антитела, состоящие только из тяжелой цепи, являются функциональными и стабильными в отсутствие легкой цепи. См., например, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993) и Sheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

В настоящем описании используется и включен ряд определений HVR. HVR, которые представляют собой определяющие комплементарность области согласно Kabat (CDR), основаны на изменчивости последовательности и используются наиболее широко (Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Вместо этого HVR Chothia относятся к положению структурных петель (Chothia и Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). "Контакт" HVR основан на анализе доступных сложных кристаллических структур. Остатки из каждой из этих HVR отмечены ниже.

Петля Kabat Chothia контакт

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 согласно Kabat)

H1 H31-H35 H26-H32 H30-H35 (нумерация согласно Chothia)

H2 H50-H65 H53-H56 H47-H58

H3 H95-H102 H95-H102 H93-H101

Если не указано иное, остатки вариабельного домена (остатки HVR и остатки каркасной области) нумеруют согласно Kabat et al. выше.

"Каркасные" или "FR" остатки представляют собой те остатки вариабельного домена, которые отличаются остатков HVR согласно определению в рамках настоящего изобретения.

Выражение "нумерация остатков вариабельного домена согласно Kabat" или "нумерация позиций аминокислот согласно Kabat" и его варианты относятся к системе нумерации, используемой для вариабельных доменов тяжелой цепи или вариабельных доменов легкой цепи согласно компиляции антител в Kabat et al. выше. При использовании этой системы нумерации реальная линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество или дополнительные аминокислоты, соответствующие сокращению или вставке в FR или HVR вариабельного домена. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может содержать одну аминокислотную вставку (остаток 52a согласно Kabat) после остатка 52 H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.д. согласно Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерацию остатков согласно Kabat можно определить для данного антитела путем выравнивания в областях гомологии последовательности антитела со "стандартной" пронумерованной последовательностью согласно Kabat.

"Акцепторный человеческий каркас" для целей настоящего изобретения представляет собой каркас, содержащий аминокислотную последовательность каркаса V_L или V_H, полученную из каркаса человеческого иммуноглобулина или человеческой консенсусной последовательности каркаса. Акцепторный человеческий каркас, "полученный из" каркаса человеческого иммуноглобулина или человеческой консенсусной последовательности каркаса, может содержать такую же его аминокислотную последовательность, или он может содержать ранее существовавшие изменения аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления количество ранее существовавших аминокислотных изменений 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.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" относительно эталонной полипептидной последовательности определен как процентное значение аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения разрывов, если необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательности, и без учета каких-либо кон-

сервативных замен в качестве части идентичности последовательности. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотной последовательности можно обеспечить разными путями, которые известны специалисту в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Например, % идентичности аминокислотной последовательности заданной аминокислотной последовательности А к, с или относительно заданной аминокислотной последовательности В (что можно альтернативно сформулировать как заданная аминокислотная последовательность А, которая имеет или содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности к, с или относительно заданной аминокислотной последовательности В) рассчитывают следующим образом:

частное X/Y умножить на 100,

где X представляет собой количество аминокислотных остатков, оцененных как идентичные совпадения по последовательности в выравнивании А и В по программе, и где Y представляет собой общее количество аминокислотных остатков в В. Понятно, что, когда длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, % идентичности аминокислотной последовательности А к В не будет равен % идентичности аминокислотной последовательности В к А.

Антитело, которое "связывается с", "специфически связывается с" или является "специфическим к" конкретному полипептиду или эпитопу на конкретном полипептиде, представляет собой антитело, которое связывается с этим конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде по существу без связывания с любым другим полипептидом или эпитопом полипептида. В некоторых вариантах осуществления связывание антитела к Siglec-8, описанного в настоящем описании (например, антитела, которое связывается с Siglec-8 человека) с неродственным полипептидом не Siglec-8 составляет менее чем приблизительно 10% связывания антитела с Siglec-8 при измерении с помощью способов, известных в данной области (например, иммуноферментного анализа (ELISA)). В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека) имеет константу (Kd) диссоциации ≤ 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} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М).

Термин "антитело против Siglec-8" или "антитело, которое связывается с Siglec-8 человека" относится к антителу, которое связывается с полипептидом или эпитопом Siglec-8 человека по существу без связывания с любым другим полипептидом или эпитопом неродственного полипептида не Siglec-8.

Термин "Siglec-8" в рамках настоящего изобретения относится к человеческому белку Siglec-8. Термин также включает существующие в природе варианты Siglec-8, включая сплайс-варианты или аллельные варианты. Аминокислотная последовательность иллюстративного человеческого Siglec-8 показана в SEQ ID NO: 72. Аминокислотная последовательность другого иллюстративного человеческого Siglec-8 показана в SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления человеческий белок Siglec-8 содержит человеческий внеклеточный домен Siglec-8, слитый с Fc-областью иммуноглобулина. Аминокислотная последовательность иллюстративного человеческого внеклеточного домена Siglec-8, слитого с Fc-областью иммуноглобулина, показана в SEQ ID NO: 74.

Аминокислотная последовательность, подчеркнутая в SEQ ID NO: 74, показывает Fc-область аминокислотной последовательности белка слияния Siglec-8-Fc.

Аминокислотная последовательность Siglec-8 человека

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPSCFSYSPQDGTSDPVHGYWFRAGDRPYQDAP
 VATNNPDREVQAETQGRFQLLDGIWSNDCSLIRDARKRDKGSYFFRLERGSMTKWSYK
 SQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHSRNLTCVPWACKQGTTPMISWIGASV
 SSPGPTTARSSVLTLPKPQDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPWNLTMTVFQ
 GDATASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELP
 RVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFL
 SFCIFIIVRSCRKKSARPAAGVGDGTMEDAKAIRGSASQGPLETESWKDGNPLKKPPAV
 APSSGEEГЕЛЬНУАТЛСФНКУВКПДПДГДТДДЕУСЕИКУНКУРЕАЕТУАКЛРННПСС
 KEVRG (SEQ ID NO:72)

Аминокислотная последовательность Siglec-8 человека

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPSCFSYSPQDGTSDPVHGYWFRAGDRPYQDAP
 VATNNPDREVQAETQGRFQLLDGIWSNDCSLIRDARKRDKGSYFFRLERGSMTKWSYK
 SQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHPRNLTCVPWACKQGTTPMISWIGASV
 SSPGPTTARSSVLTLPKPQDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPWNLTMTVFQ
 GDATASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELP
 RVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFL
 SFCIFIIVRSCRKKSARPAAGVGDGTMEDAKAIRGSASQGPLETESWKDGNPLKKPPAV
 APSSGEEГЕЛЬНУАТЛСФНКУВКПДПДГДТДДЕУСЕИКУНКУРЕАЕТУАКЛРННПСС
 KEVRG (SEQ ID NO:73)

Аминокислотная последовательность белка слияния Siglec-8-Fc

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPSCFSYSPQDGTSDPVHGYWFRAGDRPYQDAP
 VATNNPDREVQAETQGRFQLLDGIWSNDCSLIRDARKRDKGSYFFRLERGSMTKWSYK
 SQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHSRNLTCVPWACKQGTTPMISWIGASV
 SSPGPTTARSSVLTLPKPQDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPWNLTMTVFQ
 GDATASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELP
 RVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGIEGRSDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAAVEWESNGQPENNYKTPPPVLD
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:74)

Антитела, которые "индуцируют апоптоз" или являются "апоптотическими", представляют собой антитела, которые индуцируют запрограммированную гибель клеток, что определяют с помощью стандартных анализов апоптоза, таких как связывание аннексина V, фрагментация ДНК, сжатие клетки, расширение эндоплазматического ретикулума, фрагментация клетки и/или образование мембранных везикул (называемых апоптотическими тельцами). Например, апоптотическую активность антител против Siglec-8 (например, антитела, которое связывается с Siglec-8 человека) согласно настоящему раскрытию можно показать путем окрашивания клеток аннексином V.

"Эффекторные функции" антитела относятся к той биологической активности, которую можно приписать Fc-области (Fc-области нативной последовательности или Fc-области варианта аминокислотной последовательности) антитела и варьировать с изотипом антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность; связывание Fc-рецептора; антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточных рецепторов); и B-клеточной активации.

"Антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" или "ADCC" относится к форме цитотоксичности, в которой секретлируемый Ig, связанный на Fc-рецепторах (FcR), присутствующим на некоторых цитотоксических клетках (например, клетках естественных киллеров (NK), нейтрофилах и макрофагах) обеспечивает специфическое связывание этих цитотоксических эффекторных клеток с несущей антиген клеткой-мишенью, а после уничтожения клетки-мишени с цитотоксинами. Антитела "вооружают" цитотоксические клетки и необходимы для уничтожения клеток-мишеней с помощью данного механизма. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия Fc на гемопоэтических клетках приведена в табл. 3 на странице 464 Ravetch и Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящем описании антитело против Siglec-8 (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека) повышает ADCC. Для оценки ADCC активности интере-

сующих молекул можно выполнять анализ ADCC *in vitro*, например, который описан в патенте США № 5500362 или 5821337. Полезные эффекторные клетки для таких анализов включают моноядерные клетки периферической крови (PBMC) и клетки естественные киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно ADCC активность интересующей молекулы можно оценивать *in vivo*, например, в животной модели, например, которая раскрыта в Clynes et al. PNAS USA 95:652-656 (1998). Другие варианты Fc, которые изменяют ADCC активность и другие свойства антител, включают те, что раскрыты в 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 J9:115-119, 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; патентах США №№ 5624821; 5885573; 5677425; 6165745; 6277375; 5869046; 6121022; 5624821; 5648260; 6194551; 6737056; 6821505; 6277375; 7335742; и 7317091.

Термин "Fc-область" в настоящем изобретении используют для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая Fc-области нативной последовательности и варианты Fc-области. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьировать, обычное протяжение Fc-области тяжелой цепи человеческого IgG определяют от аминокислотного остатка в позиции Cys226, или от Pro230, до ее карбоксильного конца. Подходящие Fc-области нативной последовательности для использования в антителах согласно настоящему изобретению включают человеческий IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Одну аминокислотную замену (S228P согласно нумерации Kabat; обозначенную IgG4Pro) можно вводить для устранения гетерогенности, наблюдаемой в рекомбинантном IgG4 антителе. См. Angal, S. et al. (1993) Mol Immunol 30, 105-108.

"Нефукозилированное" или "фукозо-дефицитное" антитело относится к варианту гликозилированного антитела, содержащего Fc-область, в котором углеводная структура, соединенная с Fc-областью, имеет пониженную фукозу или не содержит фукозу. В некоторых вариантах осуществления антитело с пониженной фукозой или не содержащее фукозу имеет улучшенную функцию ADCC. Нефукозилированные или фукозо-дефицитные антитела имеют пониженную фукозу относительно количества фукозы в том же антителе, вырабатываемом в клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления композиция нефукозилированных или фукозо-дефицитных антител, предусмотренных в настоящем описании, представляет собой композицию, в которой менее чем приблизительно 50% N-связанных гликанов, соединенных с Fc-областью антител в композиции, содержат фукозу.

Термины "фукозилирование" или "фукозилированный" относятся к присутствию остатков фукозы в олигосахаридах, соединенных с пептидным каркасом антитела. Конкретно, фукозилированное антитело содержит α (1,6)-связанную фукозу в самом внутреннем остатке N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) в одном или обоих N-связанных олигосахаридах, соединенных с Fc-областью антитела, например, в позиции Asn 297 Fc-домена человеческого IgG1 (нумерация остатков Fc-области в EC). Asn297 также может быть расположен приблизительно+3 аминокислоты до или после позиции 297, т.е. между позициями 294 и 300, вследствие незначительных вариантов последовательности в иммуноглобулинах.

"Степень фукозилирования" представляет собой процентное значение фукозилированных олигосахаридов относительно всех олигосахаридов, идентифицированных с помощью способов, известных в данной области, например, в композиции антител, обработанных N-гликозидазой F, оцениваемой с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF MS). В композиции "полностью фукозилированных антител" по существу все олигосахариды содержат остатки фукозы, т.е. являются фукозилированными. В некоторых вариантах осуществления композиция полностью фукозилированных антител имеет степень фукозилирования по меньшей мере приблизительно 90%. Соответственно, отдельное антитело в такой композиции обычно содержит фукозные остатки в каждом из двух N-связанных олигосахаридов в Fc-области. И наоборот, в композиции "полностью нефукозилированных" антител по существу ни один из олигосахаридов не является фукозилированным, а отдельное антитело в такой композиции не содержит остатков фукозы ни в одном из двух N-связанных олигосахаридов в Fc-области. В некоторых вариантах осуществления композиция полностью нефукозилированных антител имеет степень фукозилирования менее чем приблизительно 10%. В композиции "частично фукозилированных антител" только часть олигосахаридов содержат фукозу. Отдельное антитело в такой композиции может содержать остатки фукозы ни в одном, в одном или в обоих N-связанных олигосахаридах в Fc-области, при условии, что композиция по существу не содержит все отдельные антитела, у которых нет остатков фукозы в N-связанных олигосахаридах в Fc-области, ни по существу все отдельные антитела, которые содержат остатки фукозы в обоих N-связанных олигосахаридах в Fc-области. В одном варианте осуществления композиция частично фукозилированных антител имеет степень фукозилирования от приблизительно 10% до приблизительно 80% (например, от приблизительно 50% до приблизительно 80%, от приблизительно 60% до приблизительно 80% или от приблизи-

тельно 70% до приблизительно 80%).

"Аффинность связывания" в рамках настоящего изобретения относится к силе нековалентных взаимодействий между одним участком связывания молекулы (например, антитела) и его партнера по связыванию (например, антигена). В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания антитела для Siglec-8 (которым может быть димер, такой как белок слияния Siglec-8-Fc, описанный в настоящем описании) обычно можно отображать с помощью константы диссоциации (Kd). Аффинность можно измерять с помощью обычных способов, известных в данной области, включая способы, известные в настоящем описании.

"Авидность связывания" в рамках настоящего изобретения относится к силе связывания множества участков связывания молекулы (например, антитела) и его партнера по связыванию (например, антигена).

"Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитела согласно настоящему изобретению, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которую идентифицируют и отделяют от по меньшей мере одной контаминантной молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в среде, в которой она получена. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота не имеет связи со всеми компонентами, связанными со средой получения. Выделенные молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие полипептиды и антитела согласно настоящему изобретению, находятся в форме, отличающейся от формы или окружения, в котором она обнаружена в природе. Выделенная молекулы нуклеиновых кислот вследствие этого отличаются от нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды и антитела согласно настоящему изобретению, существующие в природе в клетках.

Термин "фармацевтическая готовая форма" относится к препарату, который находится в таком виде, чтобы обеспечить эффективную биологическую активность активного ингредиента, и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для индивидуума, которому будут вводить готовую форму. Такие готовые формы являются стерильными.

"Носители" в рамках настоящего изобретения включают фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы, которые являются нетоксичными для клетки или млекопитающего, подвергаемого их воздействию в используемых дозировках и концентрациях. Часто физиологически приемлемым носителем является водный pH буферный раствор. Примеры физиологически приемлемых носителей включают такие буферы, как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярный (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептид; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глютамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие средства, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннитол или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONICS™.

В рамках изобретения термин "лечение" или "обработка" относится к клиническому вмешательству, разработанному для изменения естественного хода событий у индивидуума или клетки, подлежащих лечению в ходе клинической патологии. Желательные результаты лечения включают уменьшение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или ослабление болезненного состояния и ремиссию или улучшенный прогноз. Индивидуума успешно "лечат", например, если смягчают или устраняют один или более симптомов, связанных с заболеванием (например, воспалительным GI расстройством). Например, индивидуума успешно "лечат", если лечение приводит к повышению качества жизни людей, страдающих от заболевания, уменьшению дозы других лекарств, необходимых для лечения заболевания, уменьшению частоты рецидивов заболевания, ослаблению тяжести заболевания, задерживанию развития или прогрессирования заболевания и/или продлению выживания индивидуумов.

В рамках изобретения "в сочетании с" или "в комбинации с" относится к применению одного способа лечения в дополнение к другому способу лечения. Само по себе, "в сочетании с" или "в комбинации с" относится к применению одного способа лечения перед, в процессе или после применения другого способа лечения индивидуума.

В рамках изобретения термин "предотвращение" или "профилактика" включает обеспечение профилактики в отношении возникновения или рецидива заболевания у индивидуума. Индивидуум может быть предрасположен к заболеванию, подвержен заболеванию или иметь риск развития заболевания, но у него не диагностировано заболевание. В некоторых вариантах осуществления антитела к Siglec-8 (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), описанные в настоящем описании, используют для задержки развития заболевания (например, воспалительного GI расстройства).

В рамках изобретения индивидуум "с риском" развития заболевания (например, воспалительного GI расстройства) может иметь или не иметь обнаруживаемое заболевание или симптомы заболевания, и может иметь или не иметь выявленное обнаруживаемое заболевание или симптомы заболевания до способов лечения, описанных в настоящем описании. "С риском" означает, что у индивидуума имеется один или более факторов риска, которые представляют собой измеряемые параметры, которые коррелируют с развитием заболевания (например, воспалительным GI расстройством), как известно в данной области. Индивидуум, имеющий один или более этих факторов риска, имеет более высокую вероятность развития

заболевание, чем индивидуум без одного или более этих факторов риска.

"Эффективное количество" относится по меньшей мере к количеству, эффективному при дозировках и в течение некоторых периодов времени, необходимых для достижения нужного или указанного результата, включая терапевтический или профилактический результат. Эффективное количество можно обеспечить за одно или более введений. "Терапевтически эффективное количество" составляет по меньшей мере минимальную концентрацию, необходимую, чтобы вызвать измеримое улучшение конкретного заболевания. Терапевтически эффективное количество в настоящем описании может варьировать в соответствии с такими факторами, как состояние заболевания, возраст, пол и вес пациента и способность антитела вызывать у индивидуума нужный ответ. Терапевтически эффективным количеством также может быть количество, в котором терапевтически полезные результаты перевешивают любые токсические или вредные результаты антитела. "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному при дозировках и в течение некоторых периодов времени, необходимых для достижения нужного профилактического результата. Обычно, но не обязательно, поскольку профилактическую дозу используют у индивидуумов перед или на стадии облегчения заболевания, профилактически эффективное количество может быть меньше, чем терапевтически эффективное количество.

"Хроническое" введение относится к непрерывному введению лекарственного средства (средств) в отличие от режима острого периода, чтобы поддерживать первоначальный терапевтический эффект (активность) в течение продолжительного периода времени. Введение "с перерывами" представляет собой лечение, которое проводят не последовательно без перерыва, но имеет циклический характер.

Термин "вкладыш в упаковке" используют для обозначения инструкций, обычно включаемых в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях, касающихся использования таких терапевтических продуктов.

Используемый здесь термин "индивидуум" или "субъект" представляет собой млекопитающее. "Млекопитающее" для целей лечения включает людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных зоопарков, 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 индивидуум или субъект представляет собой человека.

II. Способы.

В настоящем описании представлены способы лечения и/или профилактики воспалительного расстройства желудочно-кишечного тракта (например, IBD или EGID) у индивидуума, включающие введение индивидууму эффективного количества антитела, описанного в настоящем описании, которое связывается с Siglec-8 человека (например, антитела к Siglec-8), или композиции, содержащей указанные антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело находится в фармацевтической композиции, содержащей антитело и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления индивидуумом является человек.

A. Воспалительные GI расстройства.

Некоторые аспекты настоящего раскрытия относятся к индивидуумам с воспалительным расстройством желудочно-кишечного тракта. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума диагностировали IBD. В некоторых вариантах осуществления имеется риск развития IBD у индивидуума были предположены разные классификации и подтипы IBD (см., например, Cleynen, I. et al. (2016) *Lancet* 387:156-167). В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется язвенный колит (например, острый язвенный колит). В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется коллагенозный колит. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется лимфоцитарный колит. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется болезнь Крона (например, болезнь Крона толстой кишки, подвздошной кишки или толстой и тонкой кишки). В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется неклассифицированное IBD толстой кишки (IBD-U). В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется хронический эозинофильный колит.

В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется язвенный колит от умеренного до тяжелого. В данной области известны критерии идентификации язвенного колита от умеренного до тяжелого; см., например, Kornbluth, A. et al. (2010) *Am. J. Gastroenterol.* 105:501-523.

В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется распространение заболевания толстой кишки больше чем приблизительно любое из следующих значений (в см): 5, 10, 15, 20, 25, 30 или 35. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется распространение заболевания толстой кишки менее чем приблизительно любое из следующих значений (в см): 40, 35, 30, 25, 20, 15 или 10. То есть, у индивидуума имеется распространение заболевания толстой кишки, имеющее верхний предел 40, 35, 30, 25, 20, 15 или 10 см и независимо выбираемый нижний предел 5, 10, 15, 20, 25, 30 или 35 см, причем верхний предел больше чем нижний предел. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется распространение заболевания толстой кишки между приблизительно 5 см и приблизительно 40 см. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется язвенный колит от умеренного до тяжелого и распространение заболевания толстой кишки между приблизительно 5 см и приблизительно 40 см.

В некоторых вариантах осуществления индивидуум не получал терапию первой линии для язвенно-

го колита или болезни Крона (например, перед введением антитела согласно настоящему изобретению). В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется язвенный колит от умеренного до тяжелого, и он не получал терапию первой линии для язвенного колита или болезни Крона (например, перед введением антитела согласно настоящему изобретению).

Термины "эталон" или "эталонное значение", используемые в настоящем описании взаимозаменяемо, могут относиться к измерению или получению характеристики значения или симптома у индивидуума без GI расстройства (или у групп таких индивидуумов). "Эталонным значением" может быть абсолютное значение; относительное значение; значение, которое имеет верхний и/или нижний предел; диапазон значений; среднее значение; медианное значение; срединное значение; или значение по сравнению с базовым значением. Аналогично, "базовым значением" может быть абсолютное значение; относительное значение; значение, которое имеет верхний и/или нижний предел; диапазон значений; среднее значение; медианное значение; срединное значение; или значение по сравнению с эталонным значением. Эталонное значение можно получать у одного индивидуума, у двух разных индивидуумов или у группы индивидуумов (например, у группы из двух, трех, четырех, пяти или более индивидуумов). В некоторых вариантах осуществления эталонное значение относится к стандартному или проверочному значению в данной области. В некоторых вариантах осуществления эталонное значение относится к значению, рассчитанному *de novo*, у одного или более индивидуумов (например, без GI расстройства).

В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется повышенное воспаление по меньшей мере в части желудочно-кишечного тракта (например, по сравнению с подходящим эталоном, таким как индивидуум без IBD, или эталонным значением). В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется повышенное количество иммунных клеток по меньшей мере в части желудочно-кишечного тракта (например, по сравнению с подходящим эталоном, таким как индивидуум без IBD, или эталонным значением). Например, в некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется повышенное количество тучных клеток, нейтрофилов, эозинофилов и/или лимфоцитов по меньшей мере в части желудочно-кишечного тракта (например, по сравнению с подходящим эталоном, таким как индивидуум без IBD, или эталонным значением). Известно, что расстройства желудочно-кишечного тракта, такие как болезнь Крона, могут влиять на любую часть желудочно-кишечного тракта. В некоторых вариантах осуществления части желудочно-кишечного тракта включают рот, глотку, пищевод, желудок, двенадцатиперстную кишку, подвздошную кишку, тощую кишку, слепую кишку, толстую кишку, прямую кишку и задний проход.

В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется повышенная проницаемость слизистой оболочки в кишечнике или толстой кишке. Проницаемость слизистой оболочки кишечника идентифицировали как критический фактор в патогенезе желудочно-кишечного тракта. Для более подробного описания проницаемости и ее измерения, см., например, Bischoff, S.C. et al. (2014) *BMC Gastroenterol.* 14:189. Иллюстративные анализы для измерения проницаемости слизистой оболочки включают без ограничения камеру Уссинга, пероральное введение зонда (например, олигосахарида, сахара или другого меченого фрагмента, который можно обнаружить в моче, если он проходит через кишечный барьер), анализы на бактериальные маркеры (например, бактериальный продукт, такой как эндотоксин или продукт ферментации или антитело, специфическое к бактериальному антигену) или анализы на биомаркер, связанный с воспалением кишечника или потерей целостности барьера. В некоторых вариантах осуществления биопсия из толстой кишки индивидуума показывает повышенную проницаемость слизистой оболочки (например, по сравнению с подходящим эталоном, таким как индивидуум без IBD, или эталонным значением).

В некоторых вариантах осуществления в образце мочи, полученном у индивидуума, имеются повышенные уровни одного или более из: N-метилгистамина, лейкотриенов и простагландинов (например, по сравнению с подходящим эталоном, таким как образец мочи, полученный у индивидуума без IBD, или эталонным значением). В некоторых вариантах осуществления в образце крови, полученном у индивидуума, имеются повышенные уровни одного или более из: IL-6, IL-8, TNF α , VEGF, PDGF и MCP-1 (например, по сравнению с подходящим эталоном, таким как образец крови, полученный у индивидуума без IBD, или эталонным значением).

В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется боль в животе, понос и/или тошнота. В некоторых вариантах осуществления индивидуум сообщает об одном или более симптомов EGID путем самостоятельного предоставления сведений, например, с помощью опросника для оценки результатов, полученной от пациента (PRO). В некоторых вариантах осуществления у индивидуума отсутствует результат, или имеется EGID с неадекватным контролем посредством одного или более предыдущих способов лечения EGID, например, PPI, системных или местных кортикостероидов и/или диеты.

Другие методики идентификации индивидуума, подлежащего лечению с помощью способов согласно настоящему изобретению, включают без ограничения анализ кала на скрытую кровь, развернутый анализ крови (CBC) (например, для диагностирования анемии или инфекции), колоноскопию, эндоскопию, магнитно-резонансную томографию (MPT), рентгеноскопию, компьютерную томографию, магнитно-резонансную (MR) энтерографию (например, для выявления свища, воспаления или сужения сосудов) или MR толстой кишки или прямой кишки.

В некоторых вариантах осуществления у индивидуума диагностировали эозинофильное расстройство желудочно-кишечного тракта (EGID), или имеется риск развития эозинофильного расстройства желудочно-кишечного тракта (EGID). EGID представляют собой расстройства, поражающие желудочно-кишечный тракт, которые характеризуются воспалением (например, эозинофильной инфильтрацией). В некоторых вариантах осуществления данное воспаление происходит без обычной для эозинофильной инфильтрации причины, такой как паразитарная инфекция, злокачественное новообразование и реакция на лекарственный препарат. EGID включают эозинофильный эзофагит (ЕОЕ), эозинофильный гастрит (EG), эозинофильный гастроэнтерит (EGE) и эозинофильный колит (ЕС).

В некоторых вариантах осуществления у индивидуума диагностировали ЕОЕ, или имеется риск развития ЕОЕ. ЕОЕ относится к расстройству пищевода, характеризующемуся инфильтрацией эозинофилов и сопутствующими патологиями, такими как боль в животе, дисфагия, затрудненное прохождение пищи, рвота, изжога, тошнота, отсутствие прибавки в весе, и проблемы с питанием. См. Furuta, G.T. и Katzka, D.A. (2015) *N. Engl. J. Med.* 373:1640-1648. В некоторых вариантах осуществления у пациента также имеется эозинофилия периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления у индивидуума диагностировали EGE, или имеется риск развития EGE. EGE относится к расстройству желудочно-кишечного (GI) тракта, характеризующемуся инфильтрацией эозинофилов в части желудочно-кишечного тракта и сопутствующими патологиями желудочно-кишечного тракта, такими как диспепсия, боль в животе, тошнота, рвота, потеря веса, понос, непроходимость, желудочно-кишечное кровотечение и асцит. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума диагностировали EGE вследствие эозинофильной инфильтрации в части одного или более из рта, глотки, пищевода, желудка, двенадцатиперстной кишки, подвздошной кишки, тощей кишки, слепой кишки, толстой кишки, прямой кишки и заднего прохода. Например, в некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется эозинофильный дуоденит, еюнит и/или илеит. В некоторых вариантах осуществления у пациента также имеется эозинофилия периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления у индивидуума диагностировали EG, или имеется риск развития EG. EG относится к расстройству, характеризующемуся инфильтрацией эозинофилов в части желудка (например, слизистой оболочки желудка) и сопутствующими патологиями желудочно-кишечного тракта, такими как диспепсия, боль в животе, тошнота, рвота, понос, потеря веса, мальабсорбция и анемия. В некоторых вариантах осуществления у пациента также имеется эозинофилия периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления у индивидуума диагностировали ЕС, или имеется риск развития ЕС. ЕС относится к расстройству толстой кишки, характеризующемуся инфильтрацией эозинофилов и сопутствующими патологиями, такими как боль в животе, понос, потеря веса, мальабсорбция, энтеропатия с потерей белка, кишечная непроходимость, утолщение толстой кишки, непроходимость толстой кишки и асцит. ЕС обычно диагностируют у детей или подростков. См. Alfad da, A.A. et al. (2011) *Therap. Adv. Gastroenterol.* 4:301-309. В некоторых вариантах осуществления у пациента также имеется эозинофилия периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется два или более, три или более или все четыре приведенных выше EGID. Например, в некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеются EGE и EG.

EGID характеризуются эозинофильной инфильтрацией в одной или более пораженных тканях или частях желудочно-кишечного тракта. В некоторых вариантах осуществления эозинофильная инфильтрация относится к присутствию 15 или более, 20 или более, или 30 или более эозинофилов в поле зрения при большом увеличении (HPF) в образце (например, биоптате, например, в результате эндоскопической биопсии), полученном из желудочно-кишечного тракта (т.е. из пищевода для ЕОЕ, желудка для EG, толстой кишки для ЕС и т.д.). В некоторых вариантах осуществления эозинофильная инфильтрация относится к присутствию в среднем 15 или более, 20 или более или 30 или более эозинофилов в поле зрения при большом увеличении (HPF) в 2, 3, 4 или 5 анализах HPF (например, из биоптата, например, в результате эндоскопической биопсии), полученной из желудочно-кишечного тракта (т.е. из пищевода для ЕОЕ, желудка для EG, толстой кишки для ЕС и т.д.). Например, множество анализов HPF (например, 2, 3, 4 или 5 анализов HPF, как описано в настоящем описании) можно получить в результате одной биопсии (см. Caldwell, J.M. et al. (2014) *J. Allergy Clin. Immunol.* 134:1114-1124) или в некоторых случаях в результате множества биопсий. В некоторых вариантах осуществления эозинофильная инфильтрация относится к присутствию 30 или более эозинофилов на HPF в 5 анализах HPF (например, из биоптата, например, в результате эндоскопической биопсии), полученного из желудочно-кишечного тракта (т.е. из пищевода для ЕОЕ, желудка для EG, толстой кишки для ЕС и т.д.). 5 анализов HPF можно получать из 1, 2, 3, 4 или 5 образцов (например, биопсии индивидуума). Другими словами, в качестве примера, 5 анализов HPF могут быть в общей сложности из 2 образцов (например, 3 анализа HPF из одного образца и 2 из другого, и не требуется 5 анализов HPF из каждого из двух образцов). В некоторых вариантах осуществления эозинофильная инфильтрация относится к присутствию 30 или более эозинофилов на HPF в 5 образцах (например, из биоптата, например, в результате эндоскопической биопсии), полученного из желудочно-кишечного тракта (т.е. из пищевода для ЕОЕ, желудка для EG, толстой кишки для ЕС и т.д.). В

некоторых вариантах осуществления эозинофильная инфильтрация относится к присутствию пикового количества эозинофилов, 50 или более, 100 или более, 150 или более, 200 или более, 250 или более или 300 или более эозинофилов в поле зрения при большом увеличении (HPF) в 2, 3, 4 или 5 анализах HPF (например, из биоптата, например, в результате эндоскопической биопсии), полученного из желудочно-кишечного тракта (т.е. из пищевода для ЕОЕ, желудка для ЕГ, толстой кишки для ЕС и т.д.). В некоторых вариантах осуществления эозинофильная инфильтрация относится к присутствию 100 или более эозинофилов/мм² в HPF или образце (например, биоптате, например, в результате эндоскопической биопсии), полученном из желудочно-кишечного тракта (т.е. из пищевода для ЕОЕ, желудка для ЕГ, толстой кишки для ЕС и т.д.). В некоторых вариантах осуществления эозинофильная инфильтрация относится к повышенному количеству эозинофилов в HPF или образце (например, по сравнению с подходящим эталоном, таким как образец у индивидуума без IBD, или эталонное значение). Также можно использовать другие методики наблюдения за желудочно-кишечным трактом, такие как эндоскопия, колоноскопия и эзофагография с барием, например, для поиска морфологических нарушений одной или более частей желудочно-кишечного тракта. См., например, Caldwell, J.M. et al. (2014) *J. Allergy Clin. Immunol.* 134:1114-1124; Furuta, G.T. и Katzka, D.A. (2015) *N. Engl. J. Med.* 373:1640-1648; и Lwin, T. et al. (2011) *Mod. Pathol.* 24:556-563.

В некоторых вариантах осуществления образец у индивидуума с ЕОЕ (например, образец из биопсии пищевода) характеризуется одной или более следующими особенностями: больше или равно 15 внутриэпителиальных эозинофилов на HPF по меньшей мере в одном отделе пищевода, измененный характер эозинофилов (например, проявляется в виде расслоения поверхности и абсцессов), эпителиальные изменения (например, гиперплазия базального слоя и/или расширенные межклеточные пространства) и утолщенные волокна собственной пластинки. В некоторых вариантах осуществления образец у индивидуума с ЕГ (например, образец из биопсии желудка) характеризуется одной или более следующими особенностями: больше или равно 30 эозинофилов на HPF в 5 анализах HPF, измененное поведение эозинофилов (например, проявляется в виде листов собственной пластинки, эозинофильного гранулематоза, эозинофильных абсцессов желез), эпителиальные изменения (например, сниженный муцин, повышенное ядерно/цитоплазматическое отношение и/или повышенная эпителиальная митотическая активность) и измененное распределение эозинофилов (например, один или более на HPF в поверхностном эпителии, более чем один на HPF в эпителии железы, избыток эозинофилов в мышечном слое слизистой оболочки или подслизистого слоя и/или концентрация эозинофилов в субэпителиальной поверхностной собственной пластинке вместо глубокой собственной пластинки). В некоторых вариантах осуществления образец у индивидуума с ЕGE (например, образец из биопсии двенадцатиперстной кишки, тощей кишки или подвздошной кишки) характеризуется одной или более следующими особенностями: более чем двукратное нормальное количество эозинофилов в собственной пластинке на HPF (например, больше чем 52 эозинофила на HPF в двенадцатиперстной кишке, или больше чем 56 эозинофилов на HPF в подвздошной кишке), измененное поведение эозинофилов (например, проявляется в виде листов собственной пластинки, эозинофильного криптита, эозинофильных абсцессов крипт), эпителиальные изменения (например, пониженный муцин, повышенное ядерно/цитоплазматическое отношение и/или повышенная эпителиальная митотическая активность), измененное распределение эозинофилов (например, больше чем 2 на HPF и больше чем 4 на HPF в поверхностном эпителии в двенадцатиперстной кишке и подвздошной кишке, соответственно; больше чем 6 на HPF и больше чем 4 на HPF в эпителии крипт в двенадцатиперстной кишке и подвздошной кишке, соответственно; избыток эозинофилов в мышечном слое слизистой оболочки или подслизистого слоя; и/или концентрация эозинофилов в субэпителиальной поверхностной собственной пластинке вместо глубокой собственной пластинки) и отсутствие клеток острого воспаления. В некоторых вариантах осуществления образец у индивидуума с ЕС (например, образец из биопсии толстой кишки) характеризуется одной или более следующими особенностями: больше чем двукратное нормальное количество эозинофилов в собственной пластинке на HPF (например, больше чем 100 эозинофилов на HPF в восходящей ободочной кишке, больше чем 84 эозинофилов на HPF в поперечной и нисходящей ободочной кишке или больше чем 64 эозинофилов на HPF в ректосигмовидном отделе ободочной кишки), измененное поведение эозинофилов (например, проявляется в виде листов собственной пластинки, эозинофильного криптита, эозинофильных абсцессов крипт), эпителиальные изменения (например, пониженный муцин, повышенное ядерно/цитоплазматическое отношение и/или повышенная эпителиальная митотическая активность), измененное распределение эозинофилов (например, больше чем 3 на HPF, больше чем 4 на HPF, и больше чем 2 на HPF в поверхностном эпителии в восходящем, поперечном/нисходящем и в ректосигмовидном отделе ободочной кишки, соответственно; больше чем 11 на HPF, больше чем 4 на HPF и больше чем 9 на HPF в эпителии крипт в восходящем, поперечном/нисходящем и в ректосигмовидном отделе ободочной кишки, соответственно; избыток эозинофилов в мышечном слое слизистой оболочки или подслизистого слоя и/или концентрация эозинофилов в субэпителиальной поверхностной собственной пластинке вместо глубокой собственной пластинки) и отсутствие клеток острого воспаления. Для более иллюстративного описания диагностических критериев для EGID, см., например, Collins, M.H. (2014) *Gastroenterol. Clin. N. Am.* 43:257-268.

В некоторых вариантах осуществления у индивидуума с EGID также наблюдается повышенная эо-

зинофилия крови (например, по сравнению с количеством эозинофилов периферической крови у индивидуума без EGID или эталонным значением). Например, в некоторых вариантах осуществления образец периферической крови, полученный у индивидуума с EGID, имеет 200 или более, 300 или более, 400 или более, 500 или более или 600 или более эозинофилов на мкл.

В настоящем изобретении показано, что экспрессия некоторых генов в мышинной модели эозинофильного гастрита (EG) и гастроэнтерита (EGE) увеличена. См. пример 3 и фиг. 12A-12E. В связи с этим в некоторых вариантах осуществления у индивидуума с EGID также наблюдается повышенная экспрессия MCPT1, MBP, CCL5, CCL2 и/или CCL17, например, в одной или более тканях желудочно-кишечного тракта (т.е. пищевода для EOE, желудка для EG, толстой кишки для ЕС и т.д.). В некоторых вариантах осуществления у индивидуума с EGID также наблюдается повышенная экспрессия MCPT1 в одной или более тканях желудочно-кишечного тракта (т.е. пищевода для EOE, желудка для EG, толстой кишки для ЕС и т.д.). В некоторых вариантах осуществления у индивидуума с EGID также наблюдается повышенная экспрессия CCL2 в одной или более тканях желудочно-кишечного тракта (т.е. пищевода для EOE, желудка для EG, толстой кишки для ЕС и т.д.). В некоторых вариантах осуществления экспрессию гена измеряют в образце биопсии, полученном из ткани индивидуума. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена относится к уровню экспрессии мРНК. В некоторых вариантах осуществления экспрессию гена измеряют относительно эталона или эталонного значения. В некоторых вариантах осуществления эталонное значение относится к экспрессии одного или более другого гена (генов), например, гена (генов) жизненно важных функций. В некоторых вариантах осуществления эталонное значение относится к экспрессии гена у одного или более индивидуумов без EGID. Эталонное значение можно получать у одного индивидуума, у двух разных индивидуумов или у группы индивидуумов (например, у группы из двух, трех, четырех, пяти или более индивидуумов). В некоторых вариантах осуществления эталонное значение относится к стандартному или проверочному значению в данной области. В некоторых вариантах осуществления эталонное значение относится к значению, рассчитанному *de novo* у одного или более индивидуумов (например, без GI расстройства).

В настоящем изобретении кроме того показано, что экспрессия некоторых генов в образце крови или сыворотки в мышинной модели эозинофильного гастрита (EG) и гастроэнтерита (EGE) увеличена. См. пример 3 и фиг. 13A-13C. В связи с этим в некоторых вариантах осуществления у индивидуума с EGID также наблюдается повышенная экспрессия CCL2 и/или CXCL1 в образце крови или сыворотки. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума с EGID также наблюдается повышенная экспрессия CCL2 в образце крови или сыворотки. В некоторых вариантах осуществления экспрессию гена измеряют в полученном у индивидуума образце крови или сыворотки. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена относится к уровню экспрессии мРНК. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена относится к уровню экспрессии белка. В некоторых вариантах осуществления экспрессию гена измеряют относительно эталона или эталонного значения. В некоторых вариантах осуществления эталонное значение относится к экспрессии одного или более другого гена (генов), например, гена (генов) жизненно важных функций. В некоторых вариантах осуществления эталонное значение относится к экспрессии гена в образце (образцах) крови или сыворотки у одного или более индивидуумов без EGID. Эталонное значение можно получать у одного индивидуума, у двух разных индивидуумов или у группы индивидуумов (например, у группы из двух, трех, четырех, пяти или более индивидуумов). В некоторых вариантах осуществления эталонное значение относится к стандартному или проверочному значению в данной области. В некоторых вариантах осуществления эталонное значение относится к значению, рассчитанному *de novo* у одного или более индивидуумов (например, без GI расстройства).

В. Ответ на лечение.

В некоторых вариантах осуществления введение индивидууму, как описано в настоящем описании (например, индивидууму, имеющему IBD, такое как колит или болезнь Крона или EGID) эффективного количества антител, описанных в настоящем описании, которые связываются с Siglec-8 человека (например, антител против Siglec-8), уменьшает один или более (например, один или более, два или более, три или более, четыре или более и т.д.) симптомов у индивидуума по сравнению с базовым уровнем перед введением антитела.

Термины "базовое" или "базовое значение", используемые в настоящем описании взаимозаменяемо, могут относиться к измерению или получению характеристик симптома перед применением терапии (например, антител против Siglec-8) или в начале применения терапии. Базовое значение можно сравнить с эталонным значением, чтобы определить уменьшение или улучшение симптома желудочно-кишечного заболевания (например, IBD или EGID), предусмотренного в настоящем описании. Эталонное значение и/или базовое значение можно получать у одного индивидуума, у двух разных индивидуумов или у группы индивидуумов (например, у группы из двух, трех, четырех, пяти или более индивидуумов).

Ответ на лечение у индивидуумов с желудочно-кишечным заболеванием (например, IBD или EGID) можно оценить с помощью способов, известных в данной области. Например, ответом на лечение у индивидуума с желудочно-кишечным заболеванием (например, IBD или EGID) может быть уменьшение или улучшение любого из его симптомов, описанных в настоящем изобретении. Симптомы IBD могут

включать, но без ограничения, понос, вздутие живота, тошноту, боль в животе, кровь в стуле, частоту жидкого стула, абсцессы брюшной полости или таза, свищи, потерю веса, усталость, лихорадку, ночную потливость и задержку роста. Симптомы ЕОЕ могут включать, но без ограничения, боль в животе, дисфагию, затрудненное прохождение пищи, рвоту, изжогу, тошноту, отсутствие прибавки в весе и проблемы с питанием. Симптомы EG могут включать, но без ограничения, диспепсию, боль в животе, тошноту, рвоту, понос, потерю веса, мальабсорбцию и анемию. Симптомы EGE могут включать, но без ограничения диспепсию, боль в животе, тошноту, рвоту, потерю веса, понос, непроходимость, желудочно-кишечное кровотечение и асцит. Симптомы ЕС могут включать, но без ограничения, боль в животе, понос, потерю веса, мальабсорбцию, энтеропатию с потерей белка, кишечную непроходимость, утолщение толстой кишки, непроходимость толстой кишки и асцит. Ответ на лечение может приводить к полной ремиссии (CR), частичной ремиссии (PR) или клиническому улучшению (CI) желудочно-кишечного заболевания (например, IBD или EGID) у индивидуума.

В данной области известны методики измерения ответа на лечение для множества желудочно-кишечных заболеваний и симптомов. Например, для мониторинга IBD методики измерения ответа на лечение могут включать без ограничения эндоскопическую оценку и бальную оценку (например, с использованием эндоскопического индекса тяжести болезни Крона, простой эндоскопической балльной оценки болезни Крона, эндоскопической шкалы оценок по Rutgeerts, индекса активности при капсульной эндоскопии CD, модифицированного индекса активности заболевания язвенного колита или шкалы Майо); ультразвук; компьютерную томографию; МРТ (например, МР-энтерографию, МР-энтероклизис или использование системы балльной оценки, такой как индекс МРТ или МР-индекс активности болезни Крона); уровни С-реактивного белка; или уровни кальпротектина, лактоферрина или эластазы в кале (см. D'Inca, R. и Caccaro, R. (2014) *Clin. Exp. Gastroenterol.* 7:151-161; Walsh, A. и Travis, S. (2012) *Gastroenterol. Hepatol. (NY)* 8:751-754). Для мониторинга EGID, методики измерения ответа на лечение могут включать без ограничения эндоскопию, колоноскопию, эзофагографию, количество эозинофилов в образце из желудочно-кишечного тракта (например, общее количество, среднее по множеству образцов и/или пиковое по множеству образцов) и количество эозинофилов в образце периферической крови.

В некоторых вариантах осуществления лечение эффективным количеством антител, описанных в настоящем изобретении, которые связываются с Siglec-8 человека (например, антител против Siglec-8), снижает активность заболевания IBD или EGID (например, с использованием индекса оценки/балльной оценки на основе эндоскопической или МРТ визуализации, такого как эндоскопический индекс тяжести болезни Крона, простой эндоскопической оценки болезни Крона, эндоскопической шкалы оценок по Rutgeerts, индекса активности при капсульной эндоскопии CD, модифицированного индекса активности заболевания язвенного колита, шкалы Майо, МРТ индекса болезни Крона или МР индекса активности и/или на основе тяжести одного или более симптомов, таких как понос, вздутие живота, тошнота, боль в животе, кровь в стуле, частота жидкого стула, абсцессы брюшной полости или таза, свищи, потеря веса, усталость, лихорадка, ночная потливость и задержка роста), снижает нейтрофилы в толстой кишке, снижает рекрутированные моноциты в толстой кишке и/или снижает резидентные макрофаги в толстой кишке. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется IBD или EGID. В некоторых вариантах осуществления антитело против Siglec-8 связывает Siglec-8 человека, экспрессированный на тучных клетках, и истощает или снижает количество тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления антителом является IgG1 антитело.

В некоторых вариантах осуществления лечения эффективное количество антител, описанных в настоящем описании, которые связываются с Siglec-8 человека (например, антител против Siglec-8), снижает эозинофилы крови, эозинофилы в тонкой кишке и/или тучные клетки в тонкой кишке. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется EGE. В некоторых вариантах осуществления антитело против Siglec-8 связывает Siglec-8 человека, экспрессированный на тучных клетках, и истощает или снижает количество тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления антителом является IgG1 антитело.

В настоящем изобретении кроме того показано, что экспрессия некоторых генов в образце крови или сыворотки в мышинной модели эозинофильного гастрита (EG) и гастроэнтерита (EGE) увеличена и уменьшается при лечении антителами к Siglec-8. См. пример 3 и фиг. 13A-13C. В связи с этим экспрессия этого гена (генов) может служить в качестве полезного биомаркера активности и/или фармакодинамики антител против Siglec-8. В некоторых вариантах осуществления экспрессия CCL2 и/или CXCL1 в образце крови или сыворотки уменьшается после введения антител против Siglec-8 согласно настоящему изобретению или композиции (например, фармацевтической композиции) согласно настоящему раскрытию, например, по сравнению с эталонным значением. В некоторых вариантах осуществления экспрессия CCL2 в образце крови или сыворотки уменьшается после введения антител против Siglec-8 согласно настоящему изобретению или композиции (например, фармацевтической композиции) согласно настоящему раскрытию, например, по сравнению с эталонным значением. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена измеряют в полученном у индивидуума образце крови или сыворотки. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена относится к уровню экспрессии мРНК. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена относится к уровню экспрессии белка. В некоторых вариантах осуществ-

ления экспрессию гена измеряют относительно эталона или эталонного значения. В некоторых вариантах осуществления экспрессию гена измеряют относительно базового уровня перед введением композиции. В некоторых вариантах осуществления эталонное значение относится к экспрессии одного или более другого гена (генов), например, гена (генов) жизненно важных функций. В некоторых вариантах осуществления эталонное значение относится к экспрессии гена в образце (образцах) крови или сыворотки у одного или более индивидуумов без EGID. Эталонное значение можно получать у одного индивидуума, у двух разных индивидуумов или у группы индивидуумов (например, у группы из двух, трех, четырех, пяти или более индивидуумов). В некоторых вариантах осуществления эталонное значение относится к стандартному или проверочному значению в данной области. В некоторых вариантах осуществления эталонное значение относится к значению, рассчитанному *de novo* у одного или более индивидуумов (например, без GI расстройства).

С. Введение.

Для профилактики или лечения заболевания подходящая дозировка активного средства будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, как определено выше, тяжести и течения заболевания, вводят ли средство для профилактических или терапевтических целей, предыдущей терапии, истории болезни индивидуума и ответа на средство и от усмотрения лечащего врача. Средство должным образом вводят индивидууму за один раз или в течение серии процедур. В некоторых вариантах осуществления интервал между введениями антител против Siglec-8 (например, антител, которые связываются с Siglec-8 человека), описанных в настоящем описании, составляет приблизительно один месяц или более. В некоторых вариантах осуществления интервал между введениями составляет приблизительно два месяца, приблизительно три месяца, приблизительно четыре месяца, приблизительно пять месяцев, приблизительно шесть месяцев или более. В рамках изобретения интервал между введениями относится к периоду времени между одним введением антитела и следующим введением антитела. В рамках изобретения интервал приблизительно один месяц включает четыре недели. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления интервал между введениями составляет приблизительно четыре недели, приблизительно пять недель, приблизительно шесть недель, приблизительно семь недель, приблизительно восемь недель, приблизительно девять недель, приблизительно десять недель, приблизительно одиннадцать недель, приблизительно двенадцать недель, приблизительно шестнадцать недель, приблизительно двадцать недель, приблизительно двадцать четыре недели или более. В некоторых вариантах осуществления лечение включает множество введений антитела, причем интервал между введениями может варьировать. Например, интервал между первым введением и вторым введением составляет приблизительно один месяц, а интервалы между последующими введениями составляют приблизительно три месяца. В некоторых вариантах осуществления интервал между первым введением и вторым введением составляет приблизительно один месяц, интервал между вторым введением и третьим введением составляет приблизительно два месяца, а интервалы между последующими введениями составляют приблизительно три месяца. В некоторых вариантах осуществления антитело против Siglec-8, описанное в настоящем описании (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), вводят в фиксированной дозе. В некоторых вариантах осуществления антитело против Siglec-8, описанное в настоящем описании (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), вводят индивидууму в дозировке от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 1800 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитело против Siglec-8 (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека) вводят индивидууму в дозировке приблизительно любой из 0,1 мг, 0,5 мг, 1 мг, 5 мг, 10 мг, 20 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 60 мг, 70 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1100 мг, 1200 мг, 1300 мг, 1400 мг, 1500 мг, 1600 мг, 1700 мг и 1800 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитело против Siglec-8, описанное в настоящем описании (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), вводят индивидууму в дозировке от приблизительно 150 мг до приблизительно 450 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитело против Siglec-8 (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека) вводят индивидууму в дозировке приблизительно любой из 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг и 450 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитело против Siglec-8, описанное в настоящем изобретении (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), вводят индивидууму в дозировке от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитело против Siglec-8, описанное в настоящем изобретении (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), вводят индивидууму в дозировке от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитело против Siglec-8, описанное в настоящем изобретении (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), вводят индивидууму в дозировке от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 1,0 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антитело против Siglec-8, описанное в настоящем изобретении, вводят индивидууму в дозировке приблизительно любой из 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. Можно использовать любую частоту приема лекарственного средства, описанную выше. Любую частоту приема лекарствен-

ного средства, описанную выше, можно использовать в способах или вариантах применения композиций, описанных в настоящем изобретении. Эффективность лечения антителом, описанным в настоящем описании (например, антителом, которое связывается с Siglec-8 человека), можно оценить с использованием любой из методик или анализов, описанных в настоящем изобретении, с интервалами, варьирующими между каждой неделей и каждыми тремя месяцами. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения (например, уменьшение или улучшение одного или более симптомов) оценивают приблизительно каждый месяц, приблизительно каждые два месяца, приблизительно каждые три месяца, приблизительно каждые четыре месяца, приблизительно каждые пять месяцев, приблизительно каждые шесть месяцев или более после введения антитела, которое связывается с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения (например, уменьшение или улучшение одного или более симптомов) оценивают приблизительно каждую неделю, приблизительно каждые две недели, приблизительно каждые три недели, приблизительно каждые четыре недели, приблизительно каждые пять недель, приблизительно каждые шесть недель, приблизительно каждые семь недель, приблизительно каждые восемь недель, приблизительно каждые девять недель, приблизительно каждые десять недель, приблизительно каждые одиннадцать недель, приблизительно каждые двенадцать недель, приблизительно каждые шестнадцать недель, приблизительно каждые двадцать недель, приблизительно каждые двадцать четыре недели или более.

В некоторых вариантах осуществления антитело против Siglec-8, описанное в настоящем изобретении (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), вводят индивидууму раз в месяц в дозировке от 0,3 мг/кг до 1,0 мг/кг путем внутривенной инфузии. В некоторых вариантах осуществления антитело против Siglec-8, описанное в настоящем изобретении (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), вводят индивидууму раз в месяц в дозировке от 0,3 мг/кг до 1,0 мг/кг путем подкожной инъекции. В некоторых вариантах осуществления антитело против Siglec-8, описанное в настоящем изобретении (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), вводят индивидууму каждые четыре недели в дозировке от 0,3 мг/кг до 1,0 мг/кг путем внутривенной инфузии. В некоторых вариантах осуществления антитело против Siglec-8, описанное в настоящем изобретении (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), вводят индивидууму каждые четыре недели в дозировке от 0,3 мг/кг до 1,0 мг/кг путем подкожной инъекции.

Антитела, описанные в настоящем изобретении, которые связываются с Siglec-8 человека, в способах, описанных в настоящем описании, можно использовать либо отдельно, либо в комбинации с другими средствами. Например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, можно вводить совместно с одним или более (например, с одним или более, двумя или более, тремя или более, четырьмя или более и т.д.) дополнительными терапевтическими средствами для лечения и/или профилактики желудочно-кишечного заболевания (например, IBD или EGID). Терапевтические средства, предусмотренные в настоящем описании для IBD, включают, но без ограничения, сульфасалазин, азатиоприн, меркаптопурин, циклоспорин, кортикостероид (например, будезонид, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон или предизон), инфликсимаб, адалимумаб, этролизумаб, голимумаб, метотрексат, натализумаб, ведолизумаб, устекинумаб, цертолизумаб пзгол и антибиотики (например, цiproфлосацин, аминогликозиды, рифамицин или метронидазол). Терапевтические средства, предусмотренные в настоящем изобретении для EGID, включают, но без ограничения, кортикостероид (например, будезонид, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон или предизон), ингибитор лейкотриена, антигистамин (например, цетиризин или кетотифен), хромогликат натрия, ингибитор протонной помпы (например, для чувствительного к PPI EOE) и сульфасалазин. В некоторых вариантах осуществления для лечения желудочно-кишечного заболевания (например, IBD или EGID) индивидуума перед введением антитела подвергают хирургическому вмешательству.

Такая комбинированная терапия, которая отмечена выше, включает комбинированное введение (когда два или более терапевтических средства содержатся в одной и той же или отдельных готовых формах) и раздельное введение, в каких случаях введение антитела согласно настоящему раскрытию может происходить перед, одновременно и/или после введения одного или более дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления введение антител против Siglec-8, описанных в настоящем описании, и введение одного или более дополнительных терапевтических средств происходит в пределах приблизительно одного месяца, приблизительно двух месяцев, приблизительно трех месяцев, приблизительно четырех месяцев, приблизительно пяти месяцев или приблизительно шести месяцев друг от друга. В некоторых вариантах осуществления введение антител против Siglec-8, описанных в настоящем изобретении, и введение одного или более дополнительных терапевтических средств происходит в пределах приблизительно одной недели, приблизительно двух недель или приблизительно трех недель друг от друга. В некоторых вариантах осуществления введение антител против Siglec-8, описанных в настоящем изобретении, и введение одного или более дополнительных терапевтических средств происходит в пределах приблизительно одного дня, приблизительно двух дней, приблизительно трех дней, приблизительно четырех дней, приблизительно пяти дней или приблизительно шести дней друг от друга.

Антитела к Siglec-8 и/или одно или более дополнительных терапевтических средств можно вводить

посредством любого подходящего пути введения, известного в данной области, включая, без ограничения, путем перорального введения, подъязычного введения, буккального введения, местного введения, ректального введения, посредством ингаляции, чрескожного введения, подкожной инъекции, внутрисуставной инъекции, внутривенной (IV) инъекции, внутриартериальной инъекции, внутримышечной инъекции, внутрисердечной инъекции, внутрикостной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, чрезслизистого введения, вагинального введения, введения в стекловидное тело, внутрисуставного введения, перисуставного введения, местного введения, накожного введения или любых их комбинаций.

D. Антитела.

В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены выделенные антитела, которые связываются с Siglec-8 человека (например, антитело-агонист, которое связывается с Siglec-8 человека). В некоторых вариантах осуществления антитело против Siglec-8, описанное в настоящем описании, имеет одну 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 авидностью чем мышинное антитело 2E2 и/или мышинное антитело 2C4; (5) имеет T_m приблизительно 70-72°C или выше в анализе теплового сдвига; (6) уменьшенная степень фукозилирования или не фукозилировано; (7) связывает Siglec-8 человека, экспрессированный на эозинофилах, и вызывает апоптоз эозинофилов; (8) связывает Siglec-8 человека, экспрессированный на тучных клетках, и истощает или снижает количество тучных клеток; (9) связывает Siglec-8 человека, экспрессированный на тучных клетках, и ингибирует FcεRI-зависимую активность тучных клеток (например, высвобождение гистамина, высвобождение PGD₂, поток Ca²⁺ и/или высвобождение β-гексозаминидазы и т.д.); (10) сконструировано для улучшения ADCC активности; (11) связывает Siglec-8 человека, экспрессированный на тучных клетках, и уничтожает тучные клетки за счет ADCC активности (*in vitro* и/или *in vivo*); (12) связывается с Siglec-8 человеческого и не являющегося человеком 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, белки слияния, описанные в настоящем описании); и (14) истощает активированные эозинофилы с EC₅₀ менее чем EC₅₀ мышинного антитела 2E2 или 2C4. Любое из антител, описанных в патенте США № 9546215 и/или WO 2015089117, может найти применение в способах, композициях и наборах, представленных в настоящем изобретении.

В одном аспекте в настоящем изобретении представлены антитела, которые связываются с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления Siglec-8 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления Siglec-8 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем описании, связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на тучных клетках, и истощает или снижает количество тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем описании, связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на тучных клетках, и ингибирует опосредованную тучными клетками активность.

В одном аспекте в изобретении представлены антитела, которые связываются с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления Siglec-8 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления Siglec-8 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем описании, 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 настоящем изобретении, 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 настоящем описании, 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 настоящем изобретении, связывается с белком слияния, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 116, но не с белком слияния, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем описании, связывается с белком слияния, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 117, но не с белком слияния, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем изобретении, связывается с белком слияния, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 117, но не с белком слияния, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 116. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем описании, связывается с линейным эпитопом во внеклеточном домене Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем изобретении, связывается с конформационным эпитопом во внеклеточном домене Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем изобретении, связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на эозинофилах, и вызывает апоптоз эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем изобретении, связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на тучных клетках, и истощает тучные клетки. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное

в настоящем изобретении, связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на тучных клетках, и ингибирует опосредованную тучными клетками активность. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем описании, связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на тучных клетках, и уничтожает тучные клетки за счет ADCC активности. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем описании, истощает тучные клетки и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело в настоящем описании истощает активированные эозинофилы и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело в настоящем описании (например, нефукозилированное антитело против Siglec-8) истощает эозинофилы крови и ингибирует активацию тучных клеток.

В настоящем изобретении представлено выделенное антитело против Siglec-8, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 не являющегося человеком примата. Идентификация антител с перекрестной реактивностью приматов будет полезна для доклинического тестирования антител против Siglec-8 у не являющегося человеком примата. В одном аспекте в изобретении представлены антитела, которые связываются с Siglec-8 не являющегося человеком примата. В одном аспекте в изобретении представлены антитела, которые связываются с Siglec-8 человека и Siglec-8 не являющегося человеком примата. В некоторых вариантах осуществления Siglec-8 не являющегося человеком примата содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118 или его часть. В некоторых вариантах осуществления Siglec-8 не являющегося человеком примата содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119 или его часть. В некоторых вариантах осуществления не являющимся человеком приматом является павиан (например, *Papio Anubis*). В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 не являющегося человеком примата, связывается с эпитопом в домене 1 Siglec-8 человека. В дополнительном варианте осуществления домен 1 Siglec-8 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 не являющегося человеком примата, связывается с эпитопом в домене 3 Siglec-8 человека. В дополнительном варианте осуществления домен 3 Siglec-8 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 не являющегося человеком примата, представляет собой гуманизованное антитело, химерное антитело или человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 не являющегося человеком примата, представляет собой мышиноое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 не являющегося человеком примата, представляет собой человеческое IgG1 антитело.

В одном аспекте антитело против Siglec-8, описанное в настоящем описании, представляет собой моноклональное антитело. В одном аспекте антитело против Siglec-8, описанное в настоящем описании, представляет собой фрагмент антитела (включая антигенсвязывающий фрагмент), например, фрагмент Fab, Fab'-SH, Fv, scFv или (Fab')₂. В одном аспекте антитело против Siglec-8, описанное в настоящем описании, содержит фрагмент антитела (включая антигенсвязывающий фрагмент), например, фрагмент Fab, Fab'-SH, Fv, scFv или (Fab')₂. В одном аспекте антитело против Siglec-8, описанное в настоящем описании, представляет собой химерное, гуманизованное или человеческое антитело. В одном аспекте любые из антител против Siglec-8, описанных в настоящем описании, являются очищенными.

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

В одном аспекте представлены антитела к Siglec-8, которые конкурируют с любым антителом против Siglec-8, описанным в настоящем описании (например, HEKA, HEKF, 1C3, 1H10, 4F11, 2C4, 2E2), за связывание с Siglec-8. Также представлены антитела к Siglec-8, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое антитело против Siglec-8, описанное в настоящем описании (например, HEKA, FLEKF, 1C3, 1H10, 4F11, 2C4, 2E2).

В одном аспекте настоящего изобретения представлены полинуклеотиды, кодирующие антитела к Siglec-8. В некоторых вариантах осуществления представлены векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие антитела к Siglec-8. В некоторых вариантах осуществления представлены клетки-хозяева, содержащие такие векторы. В другом аспекте настоящего раскрытия представлены композиции, содержащие антитела к Siglec-8 или полинуклеотиды, кодирующие антитела к Siglec-8. В некоторых вариантах осуществления композиция согласно настоящему раскрытию представляет собой фармацевтическую готовую форму для лечения IBD. В некоторых вариантах осуществления композиция согласно настоящему раскрытию представляет собой фармацевтическую готовую форму для профилактики IBD.

В одном аспекте в настоящем описании представлено антитело против Siglec-8, содержащее 1, 2, 3, 4, 5 или 6 последовательностей HVR мышиноого антитела 2C4. В одном аспекте в настоящем описании представлено антитело против Siglec-8, содержащее 1, 2, 3, 4, 5 или 6 последовательностей HVR мышиноого антитела 2E2. В некоторых вариантах осуществления HVR представляет собой CDR согласно Kabat

следовательность 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 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;
HVR-H2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; а
HVR-H3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63.

В одном варианте осуществления антитело против Siglec-8 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий каркасную последовательность и гиперпеременные области, причем 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 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;
HVR-H2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; а
HVR-H3 содержит аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 67-70.

В одном варианте осуществления антитело против Siglec-8 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий каркасную последовательность и гиперпеременные области, причем 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 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64;
HVR-L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65; а
HVR-L3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66.

В одном варианте осуществления антитело против Siglec-8 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий каркасную последовательность и гиперпеременные области, причем 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 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64;
HVR-L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65; а
HVR-L3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71.

В одном варианте осуществления этих антител переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 2-10, а переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 16-22. В одном варианте осуществления этих антител переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 2-10, а переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 23 или 24. В одном варианте осуществления этих антител переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 11-14, а переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 16-22. В одном варианте осуществления этих антител переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 11-14, а переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 23 или 24. В одном варианте осуществления этих антител переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, а переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В одном варианте осуществления этих антител переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, а переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления последовательности HVR тяжелой цепи содержат следующее:

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

В некоторых вариантах осуществления последовательности HVR тяжелой цепи содержат следующее:

a) HVR-H1 (SYAMS (SEQ ID NO:88); DYYMY (SEQ ID NO:89); или SSWMN (SEQ ID NO:90));

b) HVR-H2 (IISSGGSYTYYSDSVKG (SEQ ID NO:91); RIAPEDGDTEYAPKFQG (SEQ ID NO:92); или QIYPGDDYTNYNGKFKG (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 содержат 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); WVRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO:35); или WVRQPPGKGLEWLG (SEQ ID NO:36));

c) HC-FR3 (RFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:38); RLSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:39); RLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:40); RFSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:41); RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO:42); или RLSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:43)); и

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

В некоторых вариантах осуществления последовательности HVR легкой цепи содержат 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 содержат 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, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103;

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

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) HVR-L 1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105.

В некоторых вариантах осуществления последовательности FR легкой цепи содержат следующее:

- a) LC-FR1 (EIVLTQSPATLSLSPGKPKYICALSC (SEQ ID NO:48); или EIIITQSPATLSLSPGKPKYICALSC (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 (GIPARFSGSGSDTFTLTISLPEPDAVYYC (SEQ ID NO:55); GVPARFSGSGSDYTLTISLPEPDAVYYC (SEQ ID NO:56); GVPARFSGSGSDTFTLTISLPEPDAVYYC (SEQ ID NO:57); или GIPARFSGSGSDYTLTISLPEPDAVYYC (SEQ ID NO:58)); и
- d) LC-FR4 (FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании представлено антитело к Siglec-8 (например, гуманизованное антитело к Siglec-8), которое связывается с Siglec-8 человека, причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем антитело содержит:

(a) переменный домен тяжелой цепи, содержащий:

- (1) HC-FR1, содержащий аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 26-29;
- (2) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;
- (3) HC-FR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 31-36;
- (4) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62;
- (5) HC-FR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 38-43;
- (6) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и
- (7) HC-FR4, содержащий аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 45-46,

и/или

(b) переменный домен легкой цепи, содержащий:

- (1) LC-FR1, содержащий аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 48-49;
- (2) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64;
- (3) LC-FR2, содержащий аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 51-53;
- (4) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65;
- (5) LC-FR3, содержащий аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 55-58;
- (6) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; и
- (7) LC-FR4, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.

В одном аспекте в настоящем описании представлено антитело к Siglec-8, содержащее переменный домен тяжелой цепи, выбираемый из SEQ ID NO: 2-10, и/или содержащее переменный домен легкой цепи, выбираемый из SEQ ID NO: 16-22. В одном аспекте в настоящем описании представлено антитело к Siglec-8, содержащее переменный домен тяжелой цепи, выбираемый из SEQ ID NO: 2-14, и/или содержащее переменный домен легкой цепи, выбираемый из SEQ ID NO: 16-24. В одном аспекте в настоящем описании представлено антитело к Siglec-8, содержащее переменный домен тяжелой цепи, выбираемый из SEQ ID NO: 2-10, и/или содержащее переменный домен легкой цепи, выбираемый из SEQ ID NO: 23 или 24. В одном аспекте в настоящем описании представлено антитело к Siglec-8, содержащее переменный домен тяжелой цепи, выбираемый из SEQ ID NO: 11-14, и/или содержащее переменный домен легкой цепи, выбираемый из SEQ ID NO: 16-22. В одном аспекте в настоящем описании представлено антитело к Siglec-8, содержащее переменный домен тяжелой цепи, выбираемый из SEQ ID NO: 11-14, и/или содержащее переменный домен легкой цепи, выбираемый из SEQ ID NO: 23 или 24. В одном аспекте в настоящем описании представлено антитело к Siglec-8, содержащее переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 6 и/или содержащее переменный домен легкой цепи, выбираемый из SEQ ID NO: 16 или 21.

В одном аспекте в настоящем описании представлено антитело к Siglec-8, содержащее переменный домен тяжелой цепи, выбираемый из SEQ ID NO: 106-108, и/или содержащее переменный домен легкой цепи, выбираемый из SEQ ID NO: 109-111. В одном аспекте в настоящем описании представлено антитело к Siglec-8, содержащее переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 106, и/или содержащее переменный домен легкой цепи SEQ ID NO: 109. В одном аспекте в настоящем описании представлено 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 настоящем описании представлено 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 настоящем описании представлено антитело к Siglec-8, содержащее переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, выбираемой из SEQ ID NO: 2-14. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании представлено антитело к Siglec-8, содержащее переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по

меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, выбираемой 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% идентичность 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 аминокислоты) происходят в областях за пределами HVR (т.е. В FR). В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 106-108.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании представлено антитело к Siglec-8, содержащее переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, выбираемой из SEQ ID NO: 16-24. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании представлено антитело к Siglec-8, содержащее переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, выбираемой 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% идентичность 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 аминокислоты) происходят в областях за пределами HVR (т.е. В FR). В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 21. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 109-111.

В одном аспекте в настоящем изобретении представлено антитело к Siglec-8, содержащее (a) одну, две или три VH HVR, выбираемые из тех, что показаны в табл. 1, и/или (b) одну, две или три VL HVR, выбираемые из тех, что показаны в табл. 1.

В одном аспекте в настоящем изобретении представлено антитело к Siglec-8, содержащее (a) одну, две или три VH HVR, выбираемые из тех, что показаны в табл. 2, и/или (b) одну, две или три VL HVR, выбираемые из тех, что показаны в табл. 2.

В одном аспекте в настоящем изобретении представлено антитело к Siglec-8, содержащее (a) одну, две, три или четыре VH FR, выбираемые из тех, что показаны в табл. 3, и/или (b) одну, две, три или четыре VL FR, выбираемые из тех, что показаны в табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании представлено антитело к Siglec-8, содержащее переменный домен тяжелой цепи и/или переменный домен легкой цепи антитела, показанные в табл. 4, например, антитело НАКА, антитело НАКВ, антитело НАКС и т.д.

Аминокислотные последовательности HVR антител

Цепь Антитела	HVR1	HVR2	HVR3
антитело 2E2			
Тяжелая цепь	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALM S SEQ ID NO:62	DGSSPYYYSM EY SEQ ID NO:63
Легкая цепь	SATSSVSYM H SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPFT SEQ ID NO:66
Гуманизированные варианты тяжелой цепи 2E2 RHA, 2E2 RHB, 2E2 RHC, 2E2 RHD, 2E2 RHE, 2E2 RHF, 2E2 RHG, 2E2 RHA2 и 2E2 RHB2			
Тяжелая цепь	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALM S SEQ ID NO:62	DGSSPYYYSM EY SEQ ID NO:63
Гуманизированные варианты легкой цепи 2E2 RKA, 2E2 RKB, 2E2 RKC, 2E2 RKD, 2E2 RKE, 2E2 RKF и 2E2 RKG			
Легкая цепь	SATSSVSYM H SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPFT SEQ ID NO:66
Гуманизированные варианты тяжелой цепи 2E2 RHE S-G, 2E2 RHE E-D, 2E2 RHE Y-V, и 2E2 RHE triple			
2E2 RHE S-G	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALM S SEQ ID NO:62	DGSSPYYYGM EY SEQ ID NO:67
2E2 RHE E-D	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALM S SEQ ID NO:62	DGSSPYYYSM DY SEQ ID NO:68
2E2 RHE Y-V	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALM S SEQ ID NO:62	DGSSPYYYSM EV SEQ ID NO:69
2E2 RHE triple	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALM S SEQ ID NO:62	DGSSPYYYGM D V SEQ ID NO:70
Гуманизированные варианты легкой цепи 2E2 RKA F-Y и 2E2 RKF F-Y			
2E2 RKA F-Y	SATSSVSYM H SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPYT SEQ ID NO:71
2E2 RKF F-Y	SATSSVSYM H 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

Антител о	Цепь	HVR1	HVR2	HVR3
1C3	Тяжелая цепь	SYAMS SEQ ID NO:88	IISGGGSYTYSDSVKG SEQ ID NO:91	HETAQAAWFA Y SEQ ID NO:94
1H10	Тяжелая цепь	DYYMY SEQ ID NO:89	RIAPEDGDTEYAPKFQG SEQ ID NO:92	EGNYYGSSILD Y SEQ ID NO:95
4F11	Тяжелая цепь	SSWMN SEQ ID NO:90	QIYPGDDYTNNGKFK G SEQ ID NO:93	LGPYGPFA D SEQ ID NO:96
1C3	Легкая цепь	SASSSVSYM H SEQ ID NO:97	DTSKLAY SEQ ID NO:100	QQWSSNPPT SEQ ID NO:103
1H10	Легкая цепь	RASQDITNYL N SEQ ID NO:98	FTSRLHS SEQ ID NO:101	QQGNTLPWT SEQ ID NO:104
4F11	Легкая цепь	SASSSVSYM Y 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	QVQLKESGPG LVAPSQSLITC TVSGFSLT (SEQ ID NO:25)	WVRQPPGKGL EWLG (SEQ ID NO:30)	RLSISKDNSKS QVFLKINSLQT DDTALYYCAR (SEQ ID NO:37)	WGQGTSVTVS S (SEQ ID NO:44)
2E2 RHA	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVS (SEQ ID NO:31)	RFTISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHB	EVQLVESGGG	WVRQAPGKGL	RLSISKDNSKN	WGQGTTVTVS

	LVQPGGSLRLS CAVSGFSLT (SEQ ID NO:27)	EWLG (SEQ ID NO:32)	TVYLMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:39)	S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHC	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAVSGFSLT (SEQ ID NO:27)	WVRQAPGKGL EWVS (SEQ ID NO:31)	RFTISKDNSKN TVYLMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHD	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWLS (SEQ ID NO:33)	RFTISKDNSKN TVYLMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKN TVYLMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHF	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVS (SEQ ID NO:31)	RLTISKDNSKN TVYLMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:40)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHG	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVS (SEQ ID NO:31)	RFSISKDNSKN TVYLMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:41)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHA2	QVQLQESGPG LVKPSETLSLT CTVSGGSIS (SEQ ID NO:28)	WIRQPPGKGLE WIG (SEQ ID NO:35)	RVTISVDTSKN QFSLKLSVTA ADTAVYYCAR (SEQ ID NO:42)	WGQGLVTVS S (SEQ ID NO:46)
2E2 RHB2	QVQLQESGPG	WVRQPPGKGL	RLSISKDNSKN	WGQGLVTVS

	LVKPSETLSLT CTVSGFSLT (SEQ ID NO:29)	EWLG (SEQ ID NO:36)	QVSLKLSSVTA ADTAVYYCAR (SEQ ID NO:43)	S (SEQ ID NO:46)
2E2 RHE S-G	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKN TVYLMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE E-D	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKN TVYLMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE Y-V	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKN TVYLMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE triple	EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKN TVYLMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
Легкая цепь	FR1	FR2	FR3	FR4
2E2	QIILTQSPAIMS ASPGEKVSITC (SEQ ID NO:47)	WFQQKPGTSP KLWIY (SEQ ID NO:50)	GVPVRFSGSGS GTSYSLTISRM EAEDAATYYC (SEQ ID NO:54)	FGSGTKLEIK (SEQ ID NO:59)
RKA	EIVLTQSPATLS LSPGKPKYCAL SC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGS GTDFTLTISLE PEDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)

RKB	EIILTQSPATLS LSPGEKPYICAL SC (SEQ ID NO:49)	WFQQKPGQAP RLWIY (SEQ ID NO:52)	GVPARFSGSGS GTDYTLTISSL EPEDFAVYYC (SEQ ID NO:56)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKC	EIILTQSPATLS LSPGEKPYICAL SC (SEQ ID NO:49)	WFQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGS GTDFTLTISSLE PEDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKD	EIVLTQSPATLS LSPGEKPYICAL SC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAP RLWIY (SEQ ID NO:52)	GIPARFSGSGS GTDFTLTISSLE PEDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKE	EIVLTQSPATLS LSPGEKPYICAL SC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:51)	GVPARFSGSGS GTDFTLTISSLE PEDFAVYYC (SEQ ID NO:57)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKF	EIVLTQSPATLS LSPGEKPYICAL SC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGS GTDYTLTISSL EPEDFAVYYC (SEQ ID NO:58)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKG	EIVLTQSPATLS LSPGEKPYICAL SC (SEQ ID NO:48)	WYQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:53)	GIPARFSGSGS GTDFTLTISSLE PEDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKA F-Y	EIVLTQSPATLS LSPGEKPYICAL SC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGS GTDFTLTISSLE PEDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKF F-Y	EIVLTQSPATLS LSPGEKPYICAL SC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGS GTDYTLTISSL EPEDFAVYYC (SEQ ID NO:58)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)

Аминокислотные последовательности переменных областей антител

Название Антитела	Вариабельные области	Вариабельные области
	Тяжелой цепи	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)

	NO:13)	
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, имеющих тяжелые цепи, обозначенные α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Классы γ и α дополнительно делят на подклассы, например, у людей экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. IgG1 антитела могут существовать во многих полиморфных вариантах, называемых аллотипы (рассмотрено в Jefferis и Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4 1-7), любой из которых подходит для использования в некоторых из вариантов осуществления в настоящем описании. Общими аллотипическими вариантами в человеческой популяции являются варианты, обозначенные буквами a, f, n, z или их комбинации. В любом из вариантов осуществления в настоящем описании антитело может содержать Fc-область тяжелой цепи, представляющую собой Fc-область человеческого IgG. В дополнительных вариантах осуществления Fc-область человеческого IgG представляет собой человеческий IgG1 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антителом является IgG1 антитело. В некоторых вариантах осуществления антителом является IgG4 антитело. В некоторых вариантах осуществления человеческого IgG4 содержит аминокислотную замену S228P, причем аминокислотные остатки нумеруют в соответствии с индексом ЕС согласно Kabat. В некоторых вариантах осуществления человеческого IgG1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления человеческого IgG4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании представлено антитело к Siglec-8, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 76 или 77. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 вызывает апоптоз активированных эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 вызывает 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 снижает тучные клетки и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 истощает или снижает количество тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 уничтожает тучные клетки за счет ADCC активности. В некоторых вариантах осуществления антитело истощает или снижает тучные клетки, экспрессирующие Siglec-8 в ткани. В некоторых вариантах осуществления антитело истощает или снижает тучные клетки, экспрессирующие Siglec-8 в биологической текучей среде.

Аффинность антитела.

В некоторых аспектах антитело к Siglec-8, описанное в настоящем описании, связывается с Siglec-8 человека с приблизительно такой же или более высокой аффинностью и/или более высокой avidностью по сравнению с мышинным антителом 2E2 и/или мышинным антителом 2C4. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, представленное в настоящем описании, имеет константу (K_d) диссоциации ≤ 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 менее, 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 настоящем описании, связывается с Siglec-8 человека приблизительно с в 1,5 раза, приблизительно в 2 раза, приблизительно в 3 раза, приблизительно в 4 раза, приблизительно в 5 раз, приблизительно в 6 раз, приблизительно в 7 раз, приблизительно в 8 раз, приблизительно в 9 раз или приблизительно в 10 раз более высокой аффинностью чем мышинное антитело 2E2 и/или мышинное антитело 2C4. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 16 или 21.

В одном варианте осуществления аффинность связывания антител против Siglec-8 можно определить с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса. Например, значение K_d или K_d можно измерить с помощью использования BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc. Piscataway, N.J.) при 25°C с чипами CM5 с иммобилизованным антигеном при ~ 10 единицах резонансного сигнала (RU). В кратком изложении, биосенсорные чипы с карбоксиметилированным декстраном (CM5, BIAcore® Inc.) активируют гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) согласно инструкции поставщика. Захваченные антитела (например, против Fc человека) разводят 10 mM ацетатом натрия, pH 4,8 перед инъекцией со скоростью течения 30 мкл/минута и дополнительно иммобилизируют с антителом против Siglec-8. Для измерений кинетики двукратные серийные разведения димерного Siglec-8 инъецируют в PBS с 0,05% Tween 20 (PBST) при 25°C при скорости течения приблизительно 25 мкл/мин. Скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) вычисляют с использованием простой модели связывания один к одному Ленгмюра (Программное обеспечение для оценки BIAcore® версия 3,2) посредством одновременной аппроксимации сенсограммы ассоциации и диссоциации, равновесную константу (K_d) диссоциации вычисляют как отношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen, Y. et al. (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881.

В другом варианте осуществления для определения аффинности антитела к Siglec-8 можно использовать биослойную интерферометрию. В иллюстративном анализе Siglec-8-Fc меченый белок иммобилизируют на датчиках захвата против Fc человека и инкубируют с увеличением концентраций мышинных, химерных или гуманизированных Fab-фрагментов против Siglec-8 для получения измерений аффинности с использованием такого прибора как, например, система Octet Red 384 (ForteBio).

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

Авидность антитела.

В некоторых вариантах осуществления avidность связывания антител против Siglec-8 можно определить с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса. Например, значение K_d или K_d можно измерять с помощью использования BIAcore T100. Захваченные антитела (например, козы против Fc человека и козы против Fc мыши) иммобилизируют на чипе CM5. В проточных ячейках можно иммобилизовать антитела к Fc человека или против Fc мыши. Анализ осуществляют при определенной температуре и скорости потока, например, при 25°C со скоростью течения 30 мкл/мин. Димерный Siglec-8 разводят в аналитическом буфере в разных концентрациях, например, при концентрации в диапазоне от 15 нМ до 1,88 пМ. Антитела захватывают, и осуществляют высокопроизводительные инъекции с последующими диссоциациями. Проточные ячейки регенерируют с помощью буфера, например, 50 mM глицина, pH 1,5. Результаты стирают с помощью пустой эталонной ячейки и множества инъекций аналитического буфера и анализируют с параметрами глобального соответствия 1:1.

Конкурентные тесты.

Конкурентные тесты можно использовать для определения, связывают ли два антитела один и тот же эпитоп, путем распознавания идентичных или стерически перекрывающихся эпитопов, или ингибирует ли конкурентно одно антитело связывание другого антитела с антигеном. Эти анализы известны в данной области. Обычно, антиген или экспрессирующие антиген клетки иммобилизируют на многоразовном планшете, и измеряют способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител. Обычными метками для таких конкурентных анализов являются радиоактивные метки или ферментные метки. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, описанное в настоящем описании, конкурирует с 2E2 антителом, описанным в настоящем описании, за связывание с эпитопом, присутствующим на поверхности клетки (например, тучной клетки). В некоторых вариантах осуществления

антитело к Siglec-8, описанное в настоящем описании, конкурирует с антителом, содержащим переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, за связывание с эпитопом, присутствующим на поверхности клетки (например, тучной клетки). В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, описанное в настоящем описании, конкурирует с 2C4 антителом, описанным в настоящем описании, за связывание с эпитопом, присутствующим на поверхности клетки (например, тучной клетки). В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, описанное в настоящем описании, конкурирует с антителом, содержащим переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (как обнаружено в патенте США № 8207305), и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (как обнаружено в патенте США № 8207305), за связывание с эпитопом, присутствующим на поверхности клетки (например, тучной клетки).

Термостабильность.

В некоторых аспектах антитело к Siglec-8, описанное в настоящем изобретении, имеет температуру плавления (T_m) по меньшей мере приблизительно 70°C , по меньшей мере приблизительно 71°C или по меньшей мере приблизительно 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 1°C на цикл в qPCR термочиклере для определения T_m . В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 имеет аналогичную или более высокую T_m по сравнению с мышинным 2E2 антителом и/или мышинным 2C4 антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую 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 2C4 антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8 имеет такую же или более высокую T_m по сравнению с антителом, имеющим тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

Тесты биологической активности.

В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, описанное в настоящем изобретении, истощает тучные клетки. В данной области хорошо известны анализы для оценки апоптоза клеток, например, окрашивание Аннексом V и TUNNEL анализ.

В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, описанное в настоящем описании, вызывает ADCC активность. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, описанное в настоящем описании, уничтожает тучные клетки, экспрессирующие Siglec-8 за счет ADCC активности. 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 настоящем описании, повышает ADCC активность по сравнению с композицией, содержащей частично фукозилированные антитела к Siglec-8. Анализы для оценки ADCC активности хорошо известны в данной области и описаны в настоящем описании. В иллюстративном анализе измерения ADCC активности используют эффекторные клетки и клетки-мишени. Примеры эффекторных клеток включают в себя клетки естественные киллеры (NK), большие гранулоцитарные лимфоциты (LGL), клетки лимфокин-активированные киллеры (LAK) и PBMC, включая NK и LGL, или лейкоциты, имеющие Fc-рецепторы на клеточной поверхности, такие как нейтрофилы, эозинофилы и макрофаги. Эффекторные клетки можно выделить из любого источника, включая индивидуумов с интересующим заболеванием (например, IBD). Клеткой-мишенью является любая клетка, которая экспрессируется на клеточной поверхности антигены, которые могут распознавать подлежащие оценке антитела. Примером такой клетки-мишени является тучная клетка, которая экспрессирует на клеточной поверхности Siglec-8. Еще одним примером такой клетки-мишени является линия клеток (например, линия клеток Ramos), которая экспрессирует на клеточной поверхности Siglec-8 (например, Ramos 2C10). Клетки-мишени могут быть мечены реагентом, который обеспечивает обнаружение цитолиза. Примеры реагентов для мечения включают радиоактивное вещество, такое как хромат натрия ($\text{Na}_2 \text{}^{51}\text{CrO}_4$). См., например, *Immunology*, 14, 181 (1968); *J. Immunol. Methods*. 172, 227 (1994); и *J. Immunol. Methods*. 184, 29 (1995).

В другом иллюстративном анализе оценки ADCC и апоптотической активности антител к Siglec-8 на тучных клетках человеческие тучные клетки выделяют из тканей или биологических текучих сред человека в соответствии с опубликованными протоколами (Guhl et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2011, 75:382-384; Kulka et al. *Current Protocols in Immunology*, 2001 (John Wiley & Sons, Inc.)) или дифференцируют из человеческих гемопоэтических стволовых клеток, например, как описано у 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 отсутствии антител к Siglec-8 в течение 30 мин. с концентрациями, варьирующими между 00001 пг/мл и 10 мкг/мл,

чтобы индуцировать ADCC, образцы инкубируют в течение дальнейших 4-48 ч с очищенными клетками естественными киллерами (NK) или свежими PBL и без них. Гибель клеток за счет апоптоза или ADCC анализируют с помощью проточной цитометрии с использованием флуоресцентных конъюгированных антител для обнаружения тучных клеток (CD117 и FcεR1) и аннексина V и 7AAD для проведения различия между живыми и мертвыми или умирающими клетками. Окрашивание аннексином V и 7AAD выполняют в соответствии с инструкциями производителя.

В некоторых аспектах антитело к Siglec-8, описанное в настоящем изобретении, ингибирует опосредованную тучными клетками активность. Триптазу тучных клеток использовали в виде биомаркера на общее количество и активацию тучных клеток. Например, для оценки уменьшения тучных клеток в крови или моче можно измерить общую и активную триптазу, а также гистамин, N-метил гистамин и 11-бета-простагландин F2. См., например, публикацию заявки на выдачу патента США № US 20110293631 для иллюстративного анализа активности тучных клеток.

Е. Получение антител.

Антитело, описанное в настоящем изобретении (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), получают с использованием методик, доступных в данной области, для получения антител, иллюстративные способы которых описаны более подробно в следующем разделе.

1. Фрагменты антител.

Настоящее изобретение охватывает фрагменты антител. Фрагменты антител можно получать с помощью традиционных средств, таких как ферментативное расщепление, или с помощью рекомбинантных методик. В определенных обстоятельствах есть преимущества использования фрагментов антител, а не целых антител. Для обзора некоторых фрагментов антител, см. Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134.

Разработаны разные методики получения фрагментов антител. Традиционно эти фрагменты получали посредством 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 теперь эти фрагменты можно получать прямо с помощью рекомбинантных клеток-хозяев. Все Fab, Fv и ScFv-фрагменты антител можно экспрессировать в E.coli и секретировать из них, что обеспечивает легкое получение больших количеств этих фрагментов. Фрагменты антител можно выделять из обсуждавшихся выше фаговых библиотек антител. Альтернативно, Fab'-SH фрагменты можно извлекать непосредственно из E.coli и химически связывать с образованием F(ab')₂-фрагментов (Carter et al. Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом F(ab')₂-фрагменты можно выделять прямо из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Fab и F(ab')₂-фрагмент с увеличенным периодом полураспада in vivo, содержащий остатки эпитопа связывания рецептора реутилизации, описаны в патенте США № 5869046. Специалисту будут понятны другие методики получения фрагментов антител. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv). См. WO 93/16185; патенты США №№ 5571894; и 5587458. Fv и scFv представляют собой единственные разновидности с интактными связывающими сайтами, которые не содержат константных областей; таким образом, они могут подходить для пониженного неспецифического связывания в процессе использования in vivo, можно сконструировать белки слияния scFv для получения слияния эффекторного белка либо на amino, либо на карбокси конце scFv. См. Antibody Engineering, ed. Wortgebaeck, выше. Фрагмент антитела также может представлять собой, например, "линейное антитело", которое описано, например, в патенте США № 5641870. Такие линейные антитела могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

2. Гуманизированные антитела.

Настоящее изобретение охватывает гуманизированные антитела. В данной области известны разные способы гуманизации нечеловеческих антител. Например, гуманизированное антитело может иметь один или более аминокислотных остатков, введенных в него из нечеловеческого источника. Эти нечеловеческие аминокислотные остатки часто называют "импортные" остатки, которые обычно берут из "импортного" варибельного домена. Гуманизацию можно по существу выполнять, следуя способу Winter (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 замещения последовательностей гиперварибельной области на соответствующие последовательности человеческого антитела. Соответственно, такие "гуманизированные" антитела представляют собой химерные антитела (патент США № 4816567), в которых на соответствующую последовательность от не являющегося человеком вида замещено существенно меньше чем интактный человеческий варибельный домен. При практическом использовании гуманизированные антитела обычно представляют собой человеческие антитела, в которых некоторые остатки гиперварибельной области и возможно некоторые FR остатки замещают остатками из аналогичных участков антител грызунов.

Выбор человеческих варибельных доменов, как легких, так и тяжелых, для использования при получении гуманизированных антител может быть важным для уменьшения антигенности. В соответствии с так называемым способом "наилучшего соответствия" последовательность варибельного домена антитела грызуна (например, мыши) подвергают скринингу на основе всей библиотеки известных последовательностей человеческих варибельных доменов. Затем человеческую последовательность, которая явля-

ется наиболее близкой к последовательности грызуна, принимают в качестве человеческого каркаса для гуманизированного антитела (Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. В другом способе используют отдельный каркас, полученный из консенсусной последовательности всех человеческих антител конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Такой же каркас 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 благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели согласно одному способу гуманизированные антитела получают с помощью процесса анализа родительских последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей родительских и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов являются общедоступными и знакомы специалистам в данной области. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают возможные трехмерные конформационные структуры выбранных кандидатных последовательностей иммуноглобулина. Изучение этих проявлений позволяет анализировать вероятную роль остатков в функционировании кандидатной последовательности иммуноглобулина, то есть анализировать остатки, которые влияют на способность кандидатного иммуноглобулина связывать свой антиген. Таким образом, остатки FR можно выбирать и комбинировать из реципиентных и импортных последовательностей, так что достигается желаемая характеристика антитела, такая как повышенная аффинность к антигену (антигенам)-мишеням. В общем, остатки гипервариабельной области непосредственно и наиболее существенно участвуют во влиянии на связывание антигена.

3. Человеческие антитела.

Человеческие антитела к Siglec-8 согласно настоящему изобретению можно конструировать путем комбинирования последовательности (последовательностей) вариабельного домена Fv клона, выбираемых из библиотеки фаговых дисплеев человеческого происхождения, с известной последовательностью (последовательностями) человеческого константного домена. Альтернативно, человеческие моноклональные антитела к Siglec-8 согласно настоящему раскрытию можно получить с помощью гибридного способа. Линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека для получения человеческих моноклональных антител описаны, например, у Kozbor *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); and Boerner et al., *J. Immunol.* 147:86 (1991).

Можно получить трансгенных животных (например, мышей), которые после иммунизации способны производить полный репертуар антител человека в отсутствие продуцирования эндогенного иммуноглобулина. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена области присоединения тяжелой цепи антитела (JH) у химерных мышей и мышей с мутацией зародышевой линии приводит к полному ингибированию продуцирования эндогенных антител. Перенос массива генов иммуноглобулина зародышевой линии человека у таких мышей с мутацией зародышевой линии при заражении антигеном приводит к выработке человеческих антител. См., Например, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

Перестановку генов также можно использовать для получения человеческих антител из нечеловеческих антител (например, грызунов), когда человеческое антитело имеет сходство и специфичность с исходным нечеловеческим антителом. В соответствии с этим способом, который также называют "импринтингом эпитопа", вариабельную область тяжелой или легкой цепи фрагмента нечеловеческого антитела, полученного методами фагового дисплея, как описано в настоящем документе, заменяют набором генов V домена человека, создавая популяцию scFv или Fab химер с нечеловеческой цепью/человеческой цепью. Отбор с помощью антигена приводит к выделению химерного scFv или Fab с нечеловеческой цепью/человеческой цепью, причем человеческая цепь восстанавливает антигенсвязывающий сайт, разрушенный при удалении соответствующей нечеловеческой цепи в первичном клоне фагового дисплея, то есть эпитоп управляет выбором партнера человеческой цепи. Когда процесс повторяют для замены оставшейся нечеловеческой цепи, получают человеческое антитело (см. PCT WO 93/06213, опубликованную 1 апреля 1993 г.). В отличие от традиционной гуманизации нечеловеческих антител с помощью трансплантации CDR, этот метод обеспечивает полностью человеческие антитела, которые не имеют остатков FR или CDR нечеловеческого происхождения.

4. Биспецифические антитела.

Биспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, которые имеют специфичность связывания по меньшей мере для двух разных антигенов. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела представляют собой человеческие или гуманизированные антитела. В некоторых вариантах осуществления одна специфичность связывания относится к Siglec-8, а другая относится к любому другому антигену. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела могут связываться с двумя разными эпитопами Siglec-8. Биспецифические антитела также можно использовать для локализации цитотоксических средств в клетках, которые экспрессируют Siglec-8. Биспецифические антитела можно получать в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (напри-

мер, биспецифических антител $F(ab')_2$).

Способы получения биспецифических антител известны в данной области. См. Milstein и Cuello, *Nature*, 305: 537 (1983), WO 93/08829, опубликованную 13 мая 1993 года, и Traunecker et al. *EMBO J.* 10: 3655 (1991). Дополнительные подробности получения биспецифических антител см., например, в Suresh et al. *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986). Биспецифические антитела включают шитые или "гетероконъюгатные" антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате можно соединить с авидином, другое с биотином. Гетероконъюгатные антитела можно получить с использованием любого удобного способа перекрестного связывания. Подходящие связывающие средства хорошо известны в данной области и раскрыты в патенте США № 4676980, наряду с рядом методик перекрестного связывания.

5. Однодоменные антитела.

В некоторых вариантах осуществления антитело согласно настоящему изобретению представляет собой однодоменное антитело. Однодоменное антитело представляет собой одну полипептидную цепь, содержащую весь или часть переменного домена тяжелой цепи или весь или часть переменного домена легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело (Domantis, Inc. Waltham, Mass.; см., например, патент США № 6248516 B1). В одном варианте осуществления однодоменное антитело состоит из всего или части переменного домена тяжелой цепи антитела.

6. Варианты антитела.

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены модификация (модификации) аминокислотных последовательностей антител, описанных в настоящем описании. Например, может быть желательно улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела можно получать путем внесения соответствующих изменений в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Для достижения конечной конструкции можно получить любую комбинацию делеции, вставки и замены при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками. Аминокислотные изменения можно вводить в аминокислотную последовательность рассматриваемого антитела во время получения последовательности.

Полезный метод идентификации определенных остатков или областей антитела, которые являются предпочтительными местами для мутагенеза, называется "сканирующим аланином мутагенезом", как описано в Cunningham и Wells (1989) *Science*, 244: 1081-1085. В данном случае, чтобы влиять на взаимодействие аминокислот с антигеном, остаток или группу целевых остатков идентифицируют (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) и заменяют нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином). Затем те аминокислотные позиции, которые демонстрируют функциональную чувствительность к заменам, уточняют путем введения дополнительных или других вариантов в или для сайтов замены. Таким образом, хотя сайт для введения вариации аминокислотной последовательности задан, нет необходимости задавать характер мутации как таковой. Например, чтобы проанализировать эффективность мутации в данном сайте, в целевом кодоне или области проводят сканирующий аланином или случайный мутагенез, и экспрессированные иммуноглобулины подвергают скринингу на требуемую активность.

Вставки аминокислотной последовательности включают слияния амино- и/или карбоксильного конца длиной от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метионильным остатком. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом или полипептидом, который увеличивает период полураспада антитела в сыворотке.

В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела имеют C-концевое расщепление в тяжелой цепи и/или легкой цепи. Например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков расщепляются на C-конце тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления C-концевое расщепление удаляет C-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 расщепляются на N-конце тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления укороченные формы моноклональных антител могут быть получены рекомбинантными методами.

В некоторых вариантах осуществления антитело согласно настоящему изобретению изменяют для увеличения или уменьшения степени, в которой антитело является гликозилированным. Гликозилирование полипептидов обычно является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанный относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, представляют собой последовательности 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 гидроксиминокислоте, чаще всего серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Добавление или удаление сайтов гликозилирования в антители удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы создавать или удалять одну или несколько описанных выше трипептидных последовательностей (для N- связанных сайтов гликозилирования). Изменение также можно осуществлять путем добавления, делеции или замены в последовательности исходного антитела одного или нескольких остатков серина или треонина (для O-связанных сайтов гликозилирования).

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

В некоторых вариантах вариант гликозилирования содержит Fc-область, где в структуре углевода, присоединенной к Fc-области, отсутствует фукоза. Такие варианты имеют улучшенную функцию ADCC. Необязательно, Fc-область дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые дополнительно улучшают ADCC, например, замены в позициях 298, 333 и/или 334 Fc-области (нумерация остатков в ЕС). Примеры публикаций, относящихся к "дефукозилированным" или "фукозодефицитным" антителам, 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; WO 2005/053742; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Примеры клеточных линий, продуцирующих дефукозилированные антитела, включают клетки CHO Lec13, с недостатком фукозилирования белка (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249: 533-545 (1986); заявка на патент США № US 2003/0157108 A1, Presta, L; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., особенно в примере 11), и нокаутные клеточные линии, такие как ген альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8, нокаутные клетки CHO (Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)) и клетки, сверхэкспрессирующие β 1,4-N-ацетилгликозилтрансферазу III (GnT-III) и μ -маннозидазу Гольджи (ManII).

Настоящее изобретение относится к антителам, которые имеют пониженную фукозу относительно количества фукозы в том же антителе, которое продуцируется в клетке CHO дикого типа. Например, антитело имеет меньшее количество фукозы, чем оно имело бы в другом случае, если бы продуцировалось нативными клетками CHO (например, клеткой CHO, которая имеет нативный профиль гликозилирования, например клеткой CHO, содержащей нативный ген FUT8). В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, представленное в настоящем документе, представляет собой антитело, в котором менее чем примерно 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% или 1% N-связанных гликанов на нем содержат фукозу. В некоторых вариантах осуществления антитело к Siglec-8, представленное в настоящем документе, представляет собой антитело, в котором ни один из N-связанных гликанов на нем не содержит фукозу, т.е. где антитело полностью не содержит фукозы, или не имеет фукозы, или не является фукозилированным, или является афукозилированным. Количество фукозы может быть определено путем расчета среднего количества фукозы в сахарной цепи в Asn297 по отношению к сумме всех гликоструктур, связанных с Asn297 (например, сложных, гибридных и высокоманнозных структур), измеренных с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF, как описано, например, в WO 2008/077546. Asn297 относится к остатку аспарагина, расположенному примерно в позиции 297 в Fc-области (нумерация остатков в Fc-области в ЕС); однако Asn297 также может быть расположен примерно на ± 3 аминокислоты до или после позиции 297, то есть между позициями 294 и 300, из-за незначительных вариаций последовательности в антителах. В некоторых вариантах по меньшей мере одна или две тяжелых цепи антитела не являются фукозилированными.

В одном варианте осуществления антитело изменяют для улучшения его периода полураспада в сыворотке. Чтобы увеличить время полураспада в сыворотке антитела, можно включить эпитоп, связывающий рецептор реутилизации, в антитело (особенно фрагмент антитела), как описано, например, в патенте США № 5739277. В рамках изобретения термин "эпитоп, связывающий рецептор реутилизации" относится к эпитопу Fc-области молекулы IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), который отвечает за увеличение периода полураспада молекулы IgG в сыворотке *in vivo* (US 2003/0190311, патент США № 6821505; патент США № 616745; патент США № 5624821; патент США № 5648260; патент США № 6165455; патент США № 5834597).

Другой тип варианта представляет собой вариант аминокислотной замены. Эти варианты имеют по меньшей мере один аминокислотный остаток в молекуле антитела, замененный другим остатком. Сайты, представляющие интерес для заместительного мутагенеза, включают гипервариабельные области, но также рассматриваются изменения FR. Консервативные замены показаны в табл. 5 под заголовком "предпочтительные замены". Если такие замены приводят к желаемому изменению биологической активности, то можно вводить более существенные изменения, обозначенные в табл. 5 "иллюстративные замены", или как более подробно описано ниже со ссылкой на классы аминокислот, а продукты скринировать.

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 различаются по своему воздействию на поддержание (а) структуры полипептидного каркаса в области замещения, например, в виде листовой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте или (c) объема боковой цепи. Аминокислоты могут быть сгруппированы по сходству свойств их боковых цепей (в A.L. Lehninger, в 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) щелочные: Lys (K), Arg (R), His (H).

Альтернативно, существующие в природе остатки можно разделить на группы на основе общих свойств боковой цепи:

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

Неконсервативные замены повлекут за собой замену элемента одного из этих классов на другой класс. Такие замещенные остатки также можно вводить в консервативные сайты замещения или в оставшиеся (неконсервативные) сайты.

Один тип замещающего варианта включает замену одного или нескольких остатков гипервариабельных

бельной области исходного антитела (например, гуманизованного или человеческого антитела). Как правило, результирующий вариант (варианты), выбранный для дальнейшей разработки, будет иметь модифицированные (например, улучшенные) биологические свойства по сравнению с исходным антителом, из которого они получены. Удобный способ генерирования таких вариантов замещения включает созревание аффинности с использованием фагового дисплея. Вкратце, несколько сайтов гипервариабельной области (например, 6-7 сайтов) мутируют, чтобы генерировать все возможные аминокислотные замены в каждом сайте. Полученные таким образом антитела отображают частицами нитчатого фага в виде слияний по меньшей мере с частью белка оболочки фага (например, продукта гена III M13), упакованного внутри каждой частицы. Затем отображенные фагом варианты подвергают скринингу на их биологическую активность (например, аффинность связывания). Чтобы идентифицировать сайты-кандидаты гипервариабельной области для модификации, можно выполнить сканирующий мутагенез (например, аланиновое сканирование), чтобы идентифицировать остатки гипервариабельной области, вносящие значительный вклад в связывание антигена. Альтернативно или дополнительно, может быть полезно проанализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело, чтобы идентифицировать точки контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами на замещение в соответствии с методиками, известными в данной области, в том числе разработанными в настоящем описании. После создания таких вариантов панель вариантов подвергают скринингу с использованием методик, известных в данной области, в том числе описанных в настоящем описании, и для дальнейшей разработки можно выбрать антитела с превосходными свойствами в одном или нескольких соответствующих анализах.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотной последовательности антитела, получают различными способами, известными в данной области. Эти способы включают, но без ограничения, выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотной последовательности) или получение с помощью опосредованного олигонуклеотидами (или сайт-направленного) мутагенеза, мутагенеза ПЦР и кассетного мутагенеза ранее полученной вариантной или инвариантной версии антитела.

Может быть желательно ввести в Fc-область антител согласно настоящему изобретению одну или несколько аминокислотных модификаций, тем самым получая вариант Fc-области. Вариант Fc-области может содержать последовательность Fc-области человека (например, Fc-область человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одной или нескольких аминокислотных позициях, включая позицию в шарнирном цистеине. В некоторых вариантах осуществления вариант Fc-области содержит Fc-область человеческого IgG4. В следующем варианте осуществления Fc-область человеческого IgG4 содержит аминокислотную замену S228P, причем аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом ЕС согласно Kabat.

В соответствии с этим описанием и идеями согласно уровню техники предполагается, что в некоторых вариантах осуществления антитело согласно настоящему изобретению может содержать одно или несколько изменений по сравнению с аналогичным антителом дикого типа, например, в Fc-области. Эти антитела, тем не менее, сохраняют по существу те же характеристики, которые необходимы для терапевтического применения, по сравнению с их аналогом дикого типа. Например, считается, что в Fc-области могут быть сделаны некоторые изменения, которые будут приводить к измененному (то есть либо улучшенному, либо уменьшенному) связыванию C1q и/или зависимой от комплемента цитотоксичности (CDC), 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, касающиеся других примеров вариантов Fc-области. В WO 00/42072 (Presta) и WO 2004/056312 (Lowman) описаны варианты антител с улучшенным или уменьшенным связыванием с FcR. Содержание этих патентных публикаций специально включено в настоящее описание посредством ссылки. См. также Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9 (2): 6591-6604 (2001). Антитела с увеличенным периодом полураспада 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 2005/0014934A1 (Hinton et al.). Эти антитела содержат Fc-область с одной или несколькими заменами, которые улучшают связывание Fc-области с FcRn. Варианты полипептидов с измененными аминокислотными последовательностями Fc-области и повышенной или пониженной способностью связывания C1q описаны в патенте США № 6194551B1, WO 99/51642. Содержание этих патентных публикаций специально включено в настоящее описание посредством ссылки. См. также Idusogie et al. *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000).

7. Векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные способы.

Для рекомбинантного получения антитела согласно 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 много векторов. Выбор вектора частично зависит от используемой клетки-хозяина. Обычно клетки-хозяева имеют прокариотическое или эукариотическое происхождение (обычно от млекопитаю-

щих). Понятно, что для этой цели можно использовать константные области любого изотипа, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области можно получать от любого вида человека или животного.

Получение антител с использованием прокариотических клеток-хозяев.

а) Конструирование вектора.

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные компоненты антитела согласно настоящему изобретению, можно получать с использованием стандартных рекомбинантных методов. Желаемые полинуклеотидные последовательности можно выделять и секвенировать из антитело-продуцирующих клеток, таких как клетки гибридомы. Альтернативно, полинуклеотиды можно синтезировать с использованием синтезатора нуклеотидов или методов ПЦР. После получения последовательности, кодирующие полипептиды, встраивают в рекомбинантный вектор, способный реплицировать и экспрессировать гетерологичные полинуклеотиды в прокариотических хозяевах. Для целей настоящего раскрытия можно использовать многие векторы, доступные и известные в данной области. Выбор подходящего вектора будет зависеть главным образом от размера нуклеиновых кислот, подлежащих вставке в вектор, и конкретной клетки-хозяина, которую нужно трансформировать с помощью вектора. Каждый вектор содержит различные компоненты в зависимости от его функции (амплификации или экспрессии гетерологичного полинуклеотида или и того и другого) и его совместимости с конкретной клеткой-хозяином, в которой он находится. Компоненты вектора обычно содержат, но без ограничения: источник репликации, ген маркера селекции, промотор, сайт связывания рибосомы (RBS), сигнальную последовательность, вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты и последовательность терминации транскрипции.

Как правило, плазмидные векторы, содержащие репликон и управляющие последовательности, полученные из видов, совместимых с клеткой-хозяином, используют в связи с этими хозяевами. Вектор обычно несет сайт репликации, а также маркирующие последовательности, которые способны обеспечить фенотипический отбор в трансформированных клетках. Например, *E.coli* обычно трансформируют с использованием pBR322, плазмиды, полученной из вида *E.coli*. pBR322 содержит гены, кодирующие устойчивость к ампициллину (Amp) и тетрациклину (Tet), и, таким образом, обеспечивает простые средства для идентификации трансформированных клеток. pBR322, ее производные или другие микробные плазмиды или бактериофаг также могут содержать, или ее можно модифицировать, чтобы она содержала промоторы, которые могут использоваться микроорганизмом для экспрессии эндогенных белков. Примеры производных pBR322, используемых для экспрессии конкретных антител, подробно описаны в Carter et al., U.S. Pat. № 5648237.

Кроме того, фаговые векторы, содержащие репликон и управляющие последовательности, которые совместимы с микроорганизмом-хозяином, можно использовать в качестве трансформирующих векторов в связи с этими хозяевами. Например, для создания рекомбинантного вектора, который можно использовать для трансформации чувствительных клеток-хозяев, таких как *E.coli* LE392, можно использовать бактериофаг, такой как λ GEM.TM.-1 1.

Вектор экспрессии согласно настоящему изобретению может содержать две или более пары промотор-цистрон, кодирующие каждый из полипептидных компонентов. Промотор представляет собой не-транслируемую регуляторную последовательность, расположенную перед (5') по отношению к цистрону, который модулирует его экспрессию. Прокариотические промоторы обычно делят на два класса, индуцибельные и конститутивные. Индуцибельный промотор представляет собой промотор, который инициирует повышенные уровни транскрипции цистрона под его управлением в ответ на изменения условий культивирования, например, наличие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры.

Хорошо известно большое количество промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами. Выбранный промотор может быть функционально связан с ДНК цистрона, кодирующей легкую или тяжелую цепь, путем удаления промотора из исходной ДНК путем расщепления рестриктазой и вставки выделенной последовательности промотора в вектор согласно настоящему изобретению. Как нативную промоторную последовательность, так и многие гетерологичные промоторы можно использовать для прямой амплификации и/или экспрессии генов-мишеней. В некоторых вариантах осуществления используются гетерологичные промоторы, так как они обычно обеспечивают большую транскрипцию и более высокие выходы экспрессируемого гена-мишени по сравнению с нативным полипептидным промотором-мишенью.

Промоторы, подходящие для использования с прокариотическими хозяевами, включают промотор *PhoA*, промоторные системы *P*-галактамазы и лактозы, промоторную систему триптофана (*trp*) и гибридные промоторы, такие как промотор *tac* или *trc*. Однако также подходят другие промоторы, которые функционируют в бактериях (такие как другие известные промоторы бактерий или фагов). Их нуклеотидные последовательности были опубликованы, что позволяет квалифицированному специалисту оперативно лигировать их в цистроны, кодирующие легкие и тяжелые цепи-мишени (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269), используя линкеры или адаптеры для предоставления любых необходимых сайтов рестрикции.

В одном аспекте настоящего изобретения каждый цистрон в рекомбинантном векторе содержит компонент сигнальной последовательности секреции, который направляет транслокацию экспрессиро-

ванных полипептидов через мембрану. Обычно, сигнальная последовательность может быть компонентом вектора, или она может быть частью ДНК полипептида-мишени, которую ввели в вектор. Сигнальной последовательностью, выбранной для целей настоящего раскрытия, должна быть последовательность, которая распознается и обрабатывается клеткой-хозяином (то есть расщепляется сигнальной пептидазой). Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не обрабатывают сигнальные последовательности, нативные для гетерологичных полипептидов, сигнальную последовательность заменяют прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы, состоящей из щелочной фосфатазы, пенициллиназы, Ipp или лидеров термостабильного 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 другом аспекте продуцирование иммуноглобулинов согласно настоящему изобретению может происходить в цитоплазме клетки-хозяина и, следовательно, не требует присутствия сигнальных последовательностей секреции внутри каждого цистрона. В связи с этим легкие и тяжелые цепи иммуноглобулина экспрессируют, складывают и собирают для образования функциональных иммуноглобулинов в цитоплазме. Определенные штаммы-хозяева (например, штаммы *E.coli* trxB) обеспечивают условия цитоплазмы, которые являются благоприятными для образования дисульфидных связей, что обеспечивает правильное складывание и сборку экспрессированных белковых субъединиц. Proba and Pluckthun Gene, 159: 203 (1995).

Антитела согласно настоящему изобретению также можно получать с использованием системы экспрессии, в которой количественное соотношение экспрессируемых полипептидных компонентов можно модулировать для получения максимального выхода секретируемых и правильно собранных антител согласно настоящему изобретению. Такая модуляция достигается по меньшей мере частично путем одновременной модуляции сил трансляции для полипептидных компонентов.

Один из методов модуляции силы трансляции раскрыт у Simmons et al., патент США № 5840523. В нем используют варианты области инициации трансляции (TIR) внутри цистрона. Для данной TIR может быть создан ряд вариантов последовательности аминокислот или нуклеиновой кислоты с диапазоном трансляционных сил, обеспечивая тем самым удобное средство корректировки этого фактора для желаемого уровня экспрессии конкретной цепи. Варианты TIR могут быть получены с помощью общепринятых методов мутагенеза, которые приводят к заменам кодонов, которые могут изменять аминокислотную последовательность. В определенных вариантах осуществления изменения в нуклеотидной последовательности являются молчащими. Изменения в TIR могут включать, например, изменения количества или интервала последовательностей Шайна-Дальгарно, а также изменения в сигнальной последовательности. Одним из способов получения мутантных сигнальных последовательностей является получение "банка кодонов" в начале кодирующей последовательности, который не изменяет аминокислотную последовательность сигнальной последовательности (то есть изменения молчат). Этого можно достигнуть путем изменения третьей нуклеотидной позиции каждого кодона; кроме того, некоторые аминокислоты, такие как лейцин, серин и аргинин, имеют несколько первых и вторых позиций, которые могут усложнить создание 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 набор векторов получают с диапазоном сил TIR для каждого находящегося в нем цистрона. Этот ограниченный набор обеспечивает сравнение уровней экспрессии каждой цепи, а также выхода желаемых продуктов антител при различных комбинациях силы TIR. Силы TIR можно определить путем количественного определения уровня экспрессии репортерного гена, как подробно описано у Simmons et al. Патент США № 5840523. На основе сравнения силы трансляции выбирают желаемые отдельные TIR для объединения в конструкции вектора экспрессии согласно настоящему изобретению.

Прокариотические клетки-хозяева, подходящие для экспрессии антител согласно настоящему изобретению, включают Archaeobacteria и Eubacteria, например, 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 для настоящего раскрытия. Примеры штаммов *E.coli* включают штамм W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, DC: American Society for Microbiology, 1987), стр. 1190-1219; ATCC Deposit № 27325) и его производные, включая штамм 33D3, имеющий генотип W3110 AfhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (патент США № 5639635). Также подходят другие штаммы и их производные, такие как *E.coli* 294 (ATCC 31,446), *E.coli* B, *E.coli* λ 1776 (ATCC 31537) и *E.coli* RV308 (ATCC 31608). Эти примеры являются скорее иллюстративными, чем ограничивающими. Способы конструирования производных любой из вышеупомянутых бактерий, имеющих определенные генотипы, известны в данной области и описаны, например, в Bass et al., Proteins, 8: 309-

314 (1990). Обычно необходимо выбирать подходящие бактерии, принимая во внимание реплицируемость репликона в клетках бактерии. Например, виды *E.coli*, *Serratia* или *Salmonella* можно подходящим образом использовать в качестве хозяина, когда для доставки репликона используют хорошо известные плазмиды, такие как pBR322, pBR325, pACYC177 или pKN410. Обычно клетка-хозяин должна секретировать минимальные количества протеолитических ферментов, и желательно, чтобы в клеточную культуру были включены дополнительные ингибиторы протеазы.

b) Получение антител.

Клетки-хозяева трансформируют описанными выше векторами экспрессии и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных в зависимости от необходимости для индукции промоторов, выбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

Трансформация означает введение ДНК в прокариотический хозяин таким образом, чтобы ДНК была реплицируемой либо в виде внехромосомного элемента, либо посредством хромосомного интегранта. В зависимости от используемой клетки-хозяина трансформацию выполняют с использованием стандартных методов, подходящих для таких клеток. Обработку кальцием с использованием хлорида кальция обычно используют для бактериальных клеток, которые содержат существенные барьеры клеточной стенки. В другом методе трансформации используют полиэтиленгликоль/DMSO. Еще одной используемой методикой является электропорация.

Прокариотические клетки, используемые для получения полипептидов согласно настоящему изобретению, выращивают в средах, известных в данной области техники и подходящих для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры подходящих сред включают бульон Лурия (LB) плюс необходимые питательные добавки. В некоторых вариантах осуществления носитель также содержит селективный агент, выбранный на основе конструкции вектора экспрессии, для селективного обеспечения роста прокариотических клеток, содержащих вектор экспрессии. Например, в среду для роста клеток, экспрессирующих ген устойчивости к ампициллину, добавляют ампициллин.

Помимо источников углерода, азота и неорганического фосфата, также можно включать любые необходимые добавки в соответствующих концентрациях с введением отдельно или в виде смеси с другой добавкой или средой, такой как комплексный источник азота. Необязательно культуральная среда может содержать один или несколько восстановителей, выбранных из группы, состоящей из глутатиона, цистеина, цистамина, тиогликолата, дитиоэритрита и дитиотреитола.

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

Если в векторе экспрессии согласно настоящему изобретению используют индуцибельный промотор, экспрессию белка индуцируют в условиях, подходящих для активации промотора. В одном аспекте настоящего изобретения для контроля транскрипции полипептидов используют промоторы PhoA. Соответственно, трансформированные клетки-хозяева культивируют в среде с ограниченным фосфатом для индукции. В некоторых вариантах осуществления изобретения средой с ограниченным фосфатом является среда C.R.A.P. (см., например, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263: 133-147). В соответствии с используемой векторной конструкцией можно использовать множество других индукторов, которые известны в данной области.

В одном варианте осуществления экспрессированные полипептиды согласно настоящему изобретению секретируют и извлекают из периплазмы клеток-хозяев. Извлечение белка обычно включает разрушение микроорганизма, как правило, такими средствами, как осмотический шок, обработка ультразвуком или лизис. После разрушения клеток клеточный дебрис или целые клетки можно удалять с помощью центрифугирования или фильтрации. Белки можно дополнительно очищать, например, с помощью аффинной хроматографии на смоле. Альтернативно, белки можно транспортировать в культуральную среду и выделять в ней. Клетки можно удалять из культуры, причем культуральный супернатант фильтруют и концентрируют для дальнейшей очистки полученных белков. Экспрессированные полипептиды можно дополнительно выделять и идентифицировать с использованием общеизвестных способов, таких как электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE) и анализ Вестерн-блот.

В одном аспекте настоящего изобретения получение антител в большом количестве осуществляют с помощью процесса ферментации. Для получения рекомбинантных белков доступны различные крупномасштабные процедуры периодической ферментации с подпиткой. Для крупномасштабных ферментаций имеется емкость по меньшей мере 1000 литров, а в некоторых вариантах осуществления - от 1000 до 100000 литров. В этих ферментерах используют лопастные мешалки для распределения кислорода и питательных веществ, особенно глюкозы. Мелкомасштабная ферментация обычно относится к ферментации в ферментере, объемная емкость которого составляет не более приблизительно 100 литров, и может варьировать от приблизительно 1 литра до приблизительно 100 литров.

В процессе ферментации индукцию экспрессии белка обычно инициируют после того, как клетки

были выращены в подходящих условиях до желаемой плотности, например OD550 приблизительно 180-220, на этой стадии клетки находятся в ранней стационарной фазе. Как известно в данной области и описано выше, в соответствии с используемой конструкцией вектора можно использовать множество индукторов. Для индукции клетки можно выращивать в течение более коротких периодов. Обычно клетки индуцируют в течение приблизительно 12-50 часов, хотя можно использовать более длительное или более короткое время индукции.

Чтобы улучшить выход продукции и качество полипептидов согласно настоящему изобретению, можно изменять различные условия ферментации. Например, чтобы улучшить правильную сборку и укладку секретируемых полипептидов антител, для совместной трансформации прокариотических клеток хозяина можно использовать дополнительные векторы, сверхэкспрессирующие белки-шапероны, такие как белки Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD и или DsbG) или FkpA (пептидилпролил цис, транс-изомераза с активностью шаперона). Было показано, что белки-шапероны способствуют правильному сворачиванию и растворимости 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.

Чтобы минимизировать протеолиз экспрессированных гетерологичных белков (особенно тех, которые являются протеолитически чувствительными), для настоящего изобретения можно использовать некоторые штаммы-хозяева, имеющие дефицит протеолитических ферментов. Например, можно модифицировать штаммы клеток-хозяев для осуществления генетической мутации (мутаций) в генах, кодирующих известные бактериальные протеазы, такие как протеаза III, OmpT, DegP, Tsp, протеаза I, протеаза Mi, протеаза V, протеаза VI и их комбинации. Некоторые штаммы *E.coli* с дефицитом протеазы доступны и описаны, например, в Joly et al. (1998), выше; Georgiou et al., патент США № 5264365; Georgiou et al., патент США № 5508192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2: 63-72 (1996).

В одном варианте осуществления в системе экспрессии согласно настоящему изобретению в качестве клеток-хозяев используют штаммы *E.coli*, имеющие дефицит протеолитических ферментов и трансформированных плазмидами, сверхэкспрессирующими один или несколько белков-шаперонов.

с) Очистка антител.

В одном варианте осуществления белок антитела, полученный в настоящем описании, дополнительно очищают для дальнейших анализов и применения с целью получения препаратов, которые являются по существу гомогенными. Можно использовать стандартные способы очистки белка, известные в данной области. Следующие процедуры являются примерами подходящих процедур очистки: фракционирование на иммуноаффинных или ионообменных колонках, осаждение этанолом, обращенно-фазовая HPLC, хроматография на диоксиде кремния или на катионообменной смоле, такой как DEAE, хроматофокусирование, SDS-PAGE, осаждение сульфатом аммония и гель-фильтрация с использованием, например, Sephadex G-75.

В одном аспекте для иммуноаффинной очистки продуктов антител согласно настоящему изобретению используют белок А, иммобилизованный на твердой фазе. Белок А представляет собой белок клеточной стенки 41 кДа из *Staphylococcus aureus*, который связывается с высокой аффинностью с Fc-областью антител. Lindmark et al. (1983) *J. Immunol. Met.* 62: 1-13. Твердая фаза, на которой иммобилизован белок А, может представлять собой колонку с поверхностью из стекла или диоксида кремния или стеклянную колонку с регулируемыми порами или колонку с кремниевой кислотой. В некоторых вариантах применения колонку покрывают таким реагентом, как глицерин, чтобы возможно предотвратить неспецифическое прилипание загрязняющих веществ.

В качестве первой стадии очистки препарат, полученный из культуры клеток, которые описаны выше, можно наносить на иммобилизованную твердую фазу белка А, чтобы обеспечить специфическое связывание представляющего интерес антитела с белком А. Затем твердую фазу промывают для удаления загрязняющих веществ, не связанных специфически с твердой фазой. Наконец, с помощью элюирования из твердой фазы выделяют интересующее антитело.

Получение антител с использованием эукариотических клеток-хозяев.

Вектор для использования в эукариотической клетке-хозяине обычно содержит один или несколько следующих неограничивающих компонентов: сигнальную последовательность, источник репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор и последовательность завершения транскрипции.

а) Компонент сигнальной последовательности.

Вектор для использования в эукариотической клетке-хозяине также может содержать сигнальную последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на N-конце интересующего зрелого белка или полипептида. Выбранной гетерологичной сигнальной последовательностью может быть последовательность, которую распознает и обрабатывает (т.е. расщепляет с помощью сигнальной пептидазы) клетка-хозяин. При экспрессии клеток млекопитающих доступны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидеры, например, gD-сигнал простого герпеса. ДНК для такой области-предшественника лигируют в рамке считывания с ДНК, коди-

рующей антитело.

b) Начало репликации.

Обычно для экспрессирующих векторов млекопитающих источник репликации не требуется. Например, источник SV40 обычно можно использовать только потому, что он содержит ранний промотор.

с) Компонент отбора генов.

Векторы экспрессии и клонирования могут содержать ген селекции, также называемый селективируемым маркером. Типичные гены селекции кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (б) дополняют ауксотрофный дефицит, где это уместно, или (с) поставляют важные питательные вещества, недоступные в сложных средах.

В одном примере схемы отбора используют лекарственное средство для остановки роста клетки-хозяина. Те клетки, которые успешно трансформированы гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарству, и, таким образом, выживают в режиме отбора. В примерах такой доминантной селекции используют препараты неомицин, микофеноловая кислота и гиромидин.

Другим примером подходящих селективируемых маркеров для клеток млекопитающих являются маркеры, которые позволяют идентифицировать клетки, способные поглощать нуклеиновую кислоту антитела, такую как DHFR, тимидинкиназа, металлотионеин-I и -II, металлотионеиновые гены приматов, аденозиндеаминаза, орнитин декарбоксилаза и т.д.

Например, в некоторых вариантах осуществления клетки, трансформированные селективируемым геном DHFR, сначала идентифицируют путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, которая содержит метотрексат (Mtx), конкурентный антагонист DHFR. В некоторых вариантах осуществления подходящей клеткой-хозяином при использовании DHFR дикого типа является клеточная линия яичника китайского хомяка (CHO), дефицитная по активности DHFR (например, ATCC CRL-9096).

Альтернативно, клетки-хозяева (особенно хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), трансформированные или совместно трансформированные последовательностями ДНК, кодирующими антитело, белок DHFR дикого типа и другой селективируемый маркер, такой как аминокликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), можно отобрать путем выращивания клеток в среде, содержащей селективный агент для селективируемого маркера, такого как аминокликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418. См. патент США № 4965199. Клетки-хозяева могут содержать NS0, CHOK1, CHOK1SV или их производные, включая клеточные линии, дефицитные по глютаминсинтетазе (GS). Способы использования GS в качестве селективируемого маркера для клеток млекопитающих описаны в патенте США № 5122464 и патенте США № 5891693.

d) Промоторный компонент.

Векторы экспрессии и клонирования обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей интересующий полипептид (например, антитело). Промоторные последовательности известны для эукариот. Например, практически все эукариотические гены имеют AT-богатую область, расположенную примерно на 25-30 оснований перед сайтом, где начинается транскрипция. Другая последовательность, обнаруженная за 70-80 оснований до 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 А-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. В определенных вариантах осуществления любую или все эти последовательности можно подходящим образом вставить в эукариотические векторы экспрессии.

Транскрипцией из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих управляют, например, с помощью промоторов, полученных из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы птиц, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы быка, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и вирус обезьян 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, из актинового промотора или иммуноглобулинового промотора, из промоторов 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 вирусный источник репликации SV40. Непосредственный ранний промотор человеческого цитомегаловируса удобно получать в виде рестрикционного фрагмента HindIII E. Система для экспрессии ДНК у хозяев-млекопитающих с использованием в качестве вектора вируса бычьей папилломы раскрыта в патенте США № 4419446. Модификация этой системы описана в патенте США № 4601978. См. также Reyes et al., Nature 297: 598-601 (1982), где описана экспрессия кДНК β-интерферона человека в клетках мыши под управлением промотора тимидинкиназы из вируса простого герпеса. Альтернативно, в качестве промотора можно использовать длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

e) Компонент энхансерного элемента.

Транскрипцию ДНК, кодирующей антитело согласно настоящему изобретению у высших эукариот, часто увеличивают путем вставки в вектор энхансерной последовательности. Многие энхансерные по-

следовательности в настоящее время известны из генов млекопитающих (глобин, эластаза, альбумин, α -фетопротейн и инсулин). Однако обычно можно использовать энхансер из вируса эукариотической клетки. Примеры включают энхансер SV40 на участке позднего начала репликации (п.о. 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса человека, энхансер раннего промотора цитомегаловируса мыши, энхансер полиомы на участке позднего начала репликации и энхансеры аденовируса. См. также Yaniv, *Nature* 297: 17-18 (1982), в котором описаны энхансерные элементы для активации эукариотических промоторов. Энхансер можно вырезать и встраивать в вектор в позиции 5' или 3' относительно последовательности, кодирующей полипептид антитела, но, как правило, он находится на сайте 5' от промотора.

f) Компонент терминации транскрипции.

Векторы экспрессии, используемые в эукариотических клетках-хозяевах, также могут содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно доступны из 5', а иногда и из 3', нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибированные как полиаденилированные фрагменты в нетранслируемой части мРНК, кодирующей антитело. Одним из полезных компонентов терминации транскрипции является область полиаденилирования бычьего гормона роста. См. WO 94/11026 и вектор экспрессии, раскрытый в нем.

g) Отбор и трансформация клеток-хозяев.

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторах согласно настоящему изобретению включают клетки высших эукариот, описанные в настоящем описании, включая клетки-хозяева позвоночных. Размножение клеток позвоночных в культуре (культуре ткани) стало обычной процедурой. Примерами полезных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); эмбриональная линия клеток почки человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36:59 (1977)); клетки почек детенышей хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомяка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); клетки Сертоли мышей (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почек собак (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крыс линии buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких 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 или производные CHOK1SV и линия клеток гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют описанными выше векторами экспрессии или клонирования для получения антител и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных в зависимости от необходимости для индукции промоторов, выбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

h) Культивирование клеток-хозяев.

Клетки-хозяева, используемые для продуцирования антитела согласно настоящему изобретению, можно культивировать в различных средах. Для культивирования клеток-хозяев подходят коммерчески доступные среды, такие как Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и среда Игла в модификации Дульбекко ((DMEM), Sigma). Кроме того, в качестве культуральной среды для клеток-хозяев можно использовать любую среду, описанную 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 патенте США Re. 30985. В любую из этих сред при необходимости можно дополнять гормоны и/или другие факторы роста (такие как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), соли (такие как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферы (такие как HEPES), нуклеотиды (такие как аденозин и тимидин), антибиотики (такие как препарат GENTAMYCIN™), микроэлементы (определяемые как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозу или эквивалентный источник энергии. Также в соответствующих концентрациях можно включать любые другие добавки, которые известны специалистам в данной области. Условия культивирования, такие как температура, pH и тому подобное, такие, какие ранее применяли для клетки-хозяина, отобранной для экспрессии, и будут очевидны для специалиста в данной области техники.

i) Очистка антител.

При использовании рекомбинантных методик антитело можно получать внутриклеточно или непосредственно секретировать в среду. При внутриклеточном получении антитела на первом этапе фрагменты частиц, либо клеток-хозяев, либо лизированные фрагменты, можно удалять, например, с помощью центрифугирования или ультрафильтрации. Когда антитело секретируют в среду, супернатанты из таких систем экспрессии можно сначала концентрировать с использованием коммерчески доступного фильтра концентрации белка, например, ультрафильтрационной установки Amicon или Millipore Pellicon. В любую из вышеупомянутых стадий можно включить ингибитор протеазы, такой как PMSF, для ингибиро-

вания протеолиза, а для предотвращения роста случайных загрязнителей можно включить антибиотики.

Композицию антител, полученных из клеток, можно очищать с использованием, например, гидроксилапатитовой хроматографии, 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 Fc-домена 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 мышинных изоформ и для человеческого $\gamma 3$ (Guss et al., *EMBO J.* 5:15671575 (1986)). Матрицей, к которой присоединен аффинный лиганд, может быть агароза, но доступны и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемыми порами или полистиролдивинилбензол, обеспечивают более высокие скорости потока и более короткое время обработки, чем это может быть достигнуто с агарозой. Когда антитело содержит домен CH3, для очистки подходит смола Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.). В зависимости от антитела, которое нужно извлечь также доступны другие методы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая HPLC, хроматография на силикагеле, хроматография на гепарине SEPHAROSE™, хроматография на анионообменной или катионообменной смоле (такой как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония.

После любой стадии (стадий) предварительной очистки смесь, содержащую представляющее интерес антитело и загрязняющие вещества, можно подвергнуть дальнейшей очистке, например, с помощью хроматографии с гидрофобным взаимодействием при низком pH с использованием элюирующего буфера при pH приблизительно 2,5-4,5, выполняемой при низких концентрациях соли (например, от 0 до 0,25 М соли).

В целом, в данной области техники хорошо известны разные методики получения антител для использования в исследованиях, испытаниях и клиническом применении в соответствии с вышеописанными методиками и/или как это считает подходящим специалист в данной области техники для конкретного представляющего интерес антитела.

Получение нефукозилированных антител.

Изобретение относится к способам получения антител с пониженной степенью фукозилирования. Например, способы, рассматриваемые в настоящем документе, включают, но без ограничения, использование клеточных линий с дефицитом фукозилирования белка (например, клеток CHO Lec13, клеток CHO с нокаутным геном альфа-1,6-фукозилтрансферазы, клеток, сверхэкспрессирующих $\beta 1,4$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III и, кроме того, сверхэкспрессирующих μ -маннозидазу II Гольджи и т.д.) и добавление аналога (аналогов) фукозы в среду для культивирования клеток, используемую для получения антител. См. Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249: 533-545 (1986); заявка 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 способы снижения содержания фукозы в антителах включают технологию Glymaxx, описанную в публикации заявки на патент США № 2012/0214975. Дополнительные способы снижения содержания фукозы в антителах также включают добавление одного или нескольких 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 рамках изобретения "коровое фукозилирование" относится к добавлению фукозы ("фукозилирование") к N-ацетилглюкозамину ("GlcNAc") на восстанавливаемом конце N-связанного гликана. Также, представлены антитела, полученные с помощью таких способов, и их композиции.

В некоторых вариантах осуществления фукозилирование сложных N-гликозид-связанных сахарных цепей, связанных с Fc-областью (или доменом), снижается. В рамках изобретения "сложная N-гликозид-связанная сахарная цепь" обычно связана с аспарагином 297 (в соответствии с номером согласно Kabat), хотя сложная N-гликозид-связанная сахарная цепь также может быть связана с другими остатками аспарагина. "Сложная N-гликозид-связанная сахарная цепь" исключает сахарную цепь с высоким содержанием маннозы, в которой на невосстанавливаемом конце коровой структуры содержится только манноза, но включает 1) комплексный тип, в котором невосстанавливающая концевая сторона коровой структуры имеет одну или несколько ветвей галактозо-N-ацетилглюкозамина (также называемого "gal-GlcNAc"), а невосстанавливающая концевая сторона Gal-GlcNAc необязательно содержит сиаловую кислоту, делющую пополам N-ацетилглюкозамин. Или т.п.; или 2) гибридный тип, в котором невосстанавливающая концевая сторона коровой структуры имеет обе ветви сахарной цепи с высоким содержанием маннозы, связанной с N-гликозидом, и сложную сахарную цепь, связанную с N-гликозидом.

В некоторых вариантах осуществления "сложная N-гликозид-связанная сахарная цепь" относится к сложному типу, в котором невосстанавливающая концевая сторона коровой структуры имеет ноль, одну или несколько ветвей галактозо-N-ацетилглюкозамина (также упоминается как "gal-GlcNAc"), а невосстанавливающая концевая сторона Gal-GlcNAc, необязательно, дополнительно имеет такую структуру,

как сиаловая кислота, делящая N-ацетилглюкозамин пополам, или тому подобное.

Согласно представленным способам обычно только незначительное количество фукозы вводят в сложную связанную с N-гликозидом сахарную цепь (цепи). Например, в разных вариантах осуществления менее чем приблизительно 60%, менее чем приблизительно 50%, менее чем приблизительно 40%, менее чем приблизительно 30%, менее чем приблизительно 20%, менее чем приблизительно 15%, менее чем приблизительно 10%, менее чем приблизительно 5% или менее чем приблизительно 1% антитела имеет коровое фукозилирование фукозой в композиции. В некоторых вариантах осуществления по существу ни одно (т.е. менее чем приблизительно 0,5%) антитело не имеет корового фукозилирования фукозой в композиции. В некоторых вариантах осуществления больше чем приблизительно 40%, больше чем приблизительно 50%, больше чем приблизительно 60%, больше чем приблизительно 70%, больше чем приблизительно 80%, больше чем приблизительно 90%, больше чем приблизительно 91%, больше чем приблизительно 92%, больше чем приблизительно 93%, больше чем приблизительно 94%, больше чем приблизительно 95%, больше чем приблизительно 96%, больше чем приблизительно 97%, больше чем приблизительно 98% или больше чем приблизительно 99% антител не фукозилировано в композиции.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании представлено антитело в котором по существу ни одна (т.е. менее чем приблизительно 0,5%) связанная с N-гликозидом углеводная цепь не содержит фукозный остаток. В некоторых вариантах осуществления в настоящем описании представлено антитело, в котором по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела не фукозилированы.

Как описано выше, для экспрессии антитела можно использовать разные векторные системы экспрессии в хозяине-млекопитающем. В некоторых вариантах осуществления питательная среда не содержит фукозы. В некоторых вариантах осуществления к культуральной среде добавляют эффективное количество аналога фукозы. В этом контексте "эффективное количество" относится к количеству аналога, которое является достаточным для уменьшения содержания фукозы в сложной N-гликозидсвязанной сахарной цепи антитела по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, при по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40% или по меньшей мере приблизительно на 50%. В некоторых вариантах осуществления антитела, получаемые с помощью настоящих способов, включают по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40% или по меньшей мере приблизительно 50% некорового фукозилированного белка (например, с отсутствующим коровым фукозилированием) по сравнению с антителами, получаемыми 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 можно определить, например, как описано в примерах. Другие методы включают гидразинолиз или расщепление ферментами (см., например, "Biochemical Experimentation Methods 23: Method for Studying Glycoprotein Sugar Chain (Japan Scientific Societies Press), edited by Reiko Takahashi (1989)), флуоресцентную маркировку или маркировку радиоизотопом высвобождаемой сахарной цепи, а затем отделение меченой сахарной цепи с помощью хроматографии. Кроме того, составы высвобождаемых сахарных цепей можно определить путем анализа цепей методом НРАЕС-PAD (см., например, J. Liq Chromatogr. 6:1557 (1983)). (См. в целом публикацию патентной заявки США № 2004/0110282.).

III. Композиции.

В некоторых аспектах изобретение также относится к композициям (например, фармацевтическим композициям), содержащим любое из антител к Siglec-8, описанных в настоящем описании (например, антитело, которое связывается с Siglec-8). В некоторых аспектах изобретение относится к композиции, содержащей антитело к Siglec-8, описанное в настоящем описании, причем антитело содержит Fc-область и связанные с N-гликозидом углеводные цепи, связанные с Fc-областью, причем менее чем приблизительно 50% связанных с N-гликозидом углеводных цепей содержат остаток фукозы. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит Fc-область и связанные с N-гликозидом углеводные цепи, связанные с Fc-областью, причем менее чем приблизительно 45%, приблизительно 40%, приблизительно 35%, приблизительно 30%, приблизительно 25%, приблизительно 20% или приблизительно 15% N-гликозид-связанных углеводных цепей содержат остаток фукозы. В некоторых аспектах изобретение относится к композиции, содержащей антитело к Siglec-8, описанное в настоящем описании, причем антитело содержит Fc-область и связанные с N-гликозидом углеводные цепи, связанные с Fc-областью, причем по существу ни одна из связанных с N-гликозидом углеводных цепей не содержит остаток фукозы.

Терапевтические готовые формы готовят для хранения путем смешивания активного ингредиента, имеющего желаемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными средствами 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 являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и содержат буферы, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту, метионин, витамин E, метабисульфит натрия; консерванты, изотоники, стабилизаторы, комплексы металлов (например, ком-

плексы Zn-белок); хелатообразующие агенты, такие как EDTA и/или неионные поверхностно-активные вещества.

Для контроля pH в диапазоне, который оптимизирует терапевтическую эффективность, особенно если стабильность зависит от pH можно использовать буферы. Буферы могут присутствовать в концентрациях от приблизительно 50 мМ до приблизительно 250 мМ. Подходящие буферные средства для использования в настоящем изобретении включают как органические, так и неорганические кислоты и их соли. Например, цитрат, фосфат, сукцинат, тартрат, фумарат, глюконат, оксалат, лактат, ацетат. Кроме того, буферы могут состоять из солей гистидина и триметиламина, таких как Tris.

Для предотвращения роста микробов можно добавлять консерванты, которые обычно присутствуют в диапазоне приблизительно от 0,2 до 1,0% (м/о). Подходящие консерванты для использования согласно настоящему изобретению включают октадецилдиметилбензил хлорид аммония; хлорид гексаметония; галогениды бензалкония (например, хлорид, бромид, йодид), хлорид бензетония; тимеросал, фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанола, 3-пентанол и м-крезол.

Чтобы регулировать или поддерживать тоничность жидкости в композиции, могут присутствовать регуляторы тоничности, иногда известные как "стабилизаторы". При использовании с большими заряженными биомолекулами, такими как белки и антитела, их часто называют "стабилизаторами", потому что они могут взаимодействовать с заряженными группами боковых цепей аминокислот, тем самым уменьшая потенциал для меж- и внутримолекулярных взаимодействий, регуляторы тоничности могут присутствовать в любом количестве от приблизительно 0,1% до приблизительно 25% по массе или от приблизительно 1 до приблизительно 5% по массе с учетом относительных количеств других ингредиентов. В некоторых вариантах осуществления регуляторы тоничности включают многоатомные сахарные спирты, трехатомные или высшие сахарные спирты, такие как глицерин, эритрит, арабит, ксилит, сорбит и маннит.

Дополнительные эксципиенты включают средства, которые могут служить в качестве одного или нескольких из следующего: (1) наполнители, (2) усилители растворимости, (3) стабилизаторы и (4) и средства, предотвращающие денатурацию или адгезию к стенке контейнера. Такие эксципиенты включают: многоатомные сахарные спирты (перечисленные выше); аминокислоты, такие как аланин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин, лизин, орнитин, лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота, треонин и т.д.; органические сахара или сахарные спирты, такие как сахароза, лактоза, лактит, трегалоза, стахиоза, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, рибит, миоинизитоза, миоинизит, галактоза, галактит, глицерин, циклитолы (например, инозитол), полиэтиленгликоль; серосодержащие восстанавливающие средства, такие как мочевины, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолат натрия, тиоглицерин, α -монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низкомолекулярные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин, желатин или другие иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; моносахариды (например, ксилоза, манноза, фруктоза, глюкоза); дисахариды (например, лактоза, мальтоза, сахароза); трисахариды, такие как рафиноза; и полисахариды, такие как декстрин или декстран.

Могут присутствовать неионные поверхностно-активные вещества или детергенты (также известные как "смачивающие средства"), чтобы помочь растворять терапевтическое средство, а также защитить терапевтический белок от агрегации, вызванной взбалтыванием, что также позволяет подвергать готовую форму воздействию поверхностного напряжения сдвига, не вызывая денатурации активного терапевтического белка или антитела. Неионные поверхностно-активные вещества присутствуют в диапазоне от приблизительно 0,05 до приблизительно 1,0 мг/мл или от приблизительно 0,07 до приблизительно 0,2 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления неионные поверхностно-активные вещества присутствуют в диапазоне от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,1% м/о или от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,1% м/о или от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,025% м/о.

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 гидрогенизированное касторовое масло 10, 50 и 60, глицеринмоностеарат, эфир сахарозы и жирных кислот, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу. Анионные детергенты, которые можно использовать, включают лаурилсульфат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия и диоктилсульфонат натрия. Катионные детергенты включают хлорид бензалкония или хлорид бензетония.

Для того чтобы составы можно было использовать для введения *in vivo*, они должны быть стерильными. Состав можно сделать стерильным путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны. Терапевтические композиции согласно настоящему изобретению обычно помещают в контейнер со стерильным портом доступа, например, мешок для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

Способ введения соответствует известным и общепринятым способам, таким как однократное или многократное болюсное введение или инфузия подходящим способом в течение длительного периода

времени, например инъекция или инфузия посредством подкожного, внутривенного, внутривнутрибрюшинного, внутримышечного, внутриартериального, внутриочагового или внутрисуставного путей, местное введение, ингаляция или с помощью средства с замедленным высвобождением или с пролонгированным высвобождением.

Состав согласно настоящему изобретению может также содержать более одного активного соединения, которое необходимо для конкретного показания, подвергаемого лечению, предпочтительно соединения, которое обладает комплементарной активностью, которые не оказывают вредного влияния друг на друга. Такие активные соединения подходящим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для предполагаемой цели.

IV. Изделия или наборы.

В другом аспекте изобретение относится к изделию или набору, который содержит антитело к Siglec-8, описанное в настоящем описании (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека). Изделие или набор может дополнительно содержать инструкции по применению антитела в способах согласно настоящему раскрытию. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изделие или набор содержит инструкции по применению антитела к Siglec-8, которое связывается с Siglec-8 человека, в способах лечения и/или профилактики воспалительного расстройства желудочно-кишечного тракта (например, IBD или EGID) у индивидуума, включающих введение индивидууму эффективного количества антител к Siglec-8, которые связываются с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления изделие содержит лекарственное средство, содержащее антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, и вкладыш в упаковке, содержащий инструкции для введения лекарственного средства нуждающемуся в этом индивидууму для лечения и/или профилактики воспалительного расстройства желудочно-кишечного тракта (например, IBD или EGID). В некоторых вариантах осуществления вкладыш в упаковке дополнительно указывает, что лечение эффективно для уменьшения одного или более симптомов у индивидуума с воспалительным расстройством желудочно-кишечного тракта (например, IBD или EGID) по сравнению с базовым уровнем перед введением лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума диагностировали воспалительное расстройство желудочно-кишечного тракта (например, IBD или EGID) перед введением лекарственного средства, содержащего антитело. В некоторых вариантах осуществления индивидуумом является человек.

Изделие или набор может дополнительно содержать контейнер. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы (например, флаконы с двойной камерой), шприцы (такие как шприцы с одной или двойной камерой) и пробирки. Контейнер может быть образован из множества материалов, таких как стекло или пластмасса. В контейнере содержится готовая форма.

Изделие или набор может дополнительно содержать этикетку или вкладыш в упаковку, который находится на контейнере или связан с ним, может указывать способы восстановления и/или использования готовой формы. Этикетка или вкладыш в упаковку могут дополнительно указывать, что готовая форма полезна или предназначена для подкожного, внутривенного или других способов введения для лечения и/или профилактики воспалительного расстройства желудочно-кишечного тракта (например, IBD или EGID) у индивидуума. Контейнер, содержащий готовую форму, может представлять собой флакон одноразового использования или флакон многократного использования, что позволяет проводить повторные введения восстановленной готовой формы. Изделие или набор может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий подходящий разбавитель. Изделие или набор может дополнительно содержать другие материалы, необходимые с коммерческой, терапевтической и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по применению.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к наборам для введения разовой дозы. Такие наборы содержат контейнер с водной готовой формой терапевтического антитела, содержащий как однокамерные, так и многокамерные предварительно заполненные шприцы. Иллюстративные предварительно заполненные шприцы поставляет Vetter GmbH, Ravensburg, Germany.

В другом варианте осуществления в настоящем документе предоставлено изделие или набор, содержащий готовые формы, описанные в настоящем описании, для введения в устройстве с автоинжектором. Автоинжектор может быть описан, как инъекционное устройство, которое после активации доставит свое содержимое без дополнительных необходимых действий со стороны пациента или персонала. Они особенно подходят для самолечения терапевтическими готовыми формами, когда скорость доставки должна быть постоянной, а время доставки превышает несколько мгновений.

В другом аспекте представлено изделие или набор, который содержит антитело к Siglec-8, описанное в настоящем описании (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека). Изделие или набор может дополнительно содержать инструкции для использования антитела в способах согласно настоящему раскрытию. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изделие или набор содержит инструкции для использования антитела к Siglec-8, которые связываются с Siglec-8 человека, в способах лечения или профилактики воспалительного расстройства желудочно-кишечного тракта (например, IBD или EGID) у индивидуума, включающих введение индивидууму эффективного количества антител к Siglec-8, которые связываются с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления из-

делие или набор содержит лекарственное средство, содержащее антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, и вкладыш в упаковке, содержащий инструкции для введения лекарственного средства нуждающемуся в этом индивидууму для лечения и/или профилактики воспалительного расстройства желудочно-кишечного тракта (например, IBD или EGID).

Изобретение также относится к изделию или набору, который содержит антитело к Siglec-8, описанное в настоящем описании (например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), в комбинации с одним или более дополнительным лекарственным средством (например, вторым лекарственным средством) для лечения или профилактики воспалительного расстройства желудочно-кишечного тракта (например, IBD или EGID) у индивидуума. Изделие или набор может дополнительно содержать инструкции для использования антитела в комбинации с одним или более дополнительным лекарственным средством в способах согласно настоящему раскрытию. Например, изделие или набор согласно настоящему изобретению необязательно дополнительно содержит контейнер, содержащий второе лекарственное средство, причем антитело к Siglec-8 представляет собой первое лекарственное средство, и это изделие или набор дополнительно содержит инструкции на этикетке или вкладыше в упаковке для лечения индивидуума вторым лекарственным средством, в эффективном количестве. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изделие или набор содержит инструкции для использования антител к Siglec-8, которые связываются с Siglec-8 человека, в комбинации с одним или более дополнительным лекарственным средством в способах лечения или профилактики воспалительного расстройства желудочно-кишечного тракта (например, IBD или EGID) у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления изделие или набор содержит лекарственное средство, содержащее антитело, которое связывается с Siglec-8 человека (например, первое лекарственное средство), одно или более дополнительное лекарственное средство и вкладыш в упаковке, содержащий инструкции для введения первого лекарственного средства в комбинации с одним или более дополнительным лекарственным средством (например, вторым лекарственным средством). В некоторых вариантах осуществления одно или более дополнительных терапевтических средств могут включать, но без ограничения, сульфасалазин, азатиоприн, меркаптопурин, циклоспорин, кортикостероид (например, будезонид, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон или предизон), инфликсимаб, адалимумаб, этролизумаб, голимумаб, метотрексат, нализумаб, ведолизумаб, устекинумаб, цертолизумаб пэгол, антибиотики (например, цiproфлоксацин, аминогликозиды, рифамиксин или метронидазол), ингибитор лейкотриена, антигистамин, хромогликат натрия и ингибитор протонной помпы (PPI).

Следует понимать, что аспекты и варианты осуществления, описанные в настоящем описании, предназначены только для иллюстративных целей и что разные модификации или изменения в их свете будут предложены специалистам в данной области и должны быть включены в сущность и сферу применения настоящего изобретения и объем приложенной формулы изобретения.

Примеры

Настоящее изобретение будет лучше понято за счет ссылки на следующие примеры. Однако примеры не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего раскрытия. Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем описании, 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 настоящего изобретения и объем приложенной формулы изобретения.

Пример 1. Результаты лечения антителами к Siglec-8 в мышинной модели индуцированного DSS желудочно-кишечного воспаления.

Чтобы оценить, влияет ли лечение антителами к Siglec-8 на сложную связанную с заболеванием патологию IBD или эозинофильного заболевания желудочно-кишечного тракта, использовали мышиную модель *in vivo* вызванного DSS колита. Эту модель широко использовали для изучения IBD из-за его большого сходства с IBD человека (см. Perse, M. and Cerar, A. (2012) *J. Biomed. Biotechnol.* 2012: 718617). Действительно, мышинная модель вызванного DSS колита была подтверждена как важная модель *in vivo* для тестирования влияния многочисленных терапевтических средств на IBD (Melgar, S. et al. (2008) *Int. Immunopharmacol.* 8:836-844). Эту модель также использовали для изучения хронического эозинофильного колита (Mishra, A. et al. (2013) *J. Gastroenterol. Hepatol. Res.* 2:845-853). В следующем примере сообщается об оценке антитела к Siglec-8 в качестве потенциального терапевтического средства для лечения IBD в этой обоснованной модели *in vivo*.

Материалы и методы.

Вызванная DSS мышинная модель IBD и лечения антителами к Siglec-8.

Трансгенные мыши Siglec-8 C57BL/6 либо получали обычную питьевую воду, либо их подвергали воздействию 3,5% DSS (36000-50000 MW) без ограничения в питьевой воде в течение 5 дней, а затем они получали обычную питьевую воду в течение дополнительных 4 дней. Мышам, обработанным DSS, на 2-й день после введения DSS внутрибрюшинно вводили (IP) mAb изотипического контроля или mAb против Siglec-8 (m2E2 IgG1, имеющее последовательности доменов VH и VL SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 15, соответственно).

Индекс активности заболевания (DAI).

У мышей, которых лечили, как описано выше, измеряли DAI по стандартной методике (см. Friedman, D.J. et al. (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. 106: 16788-16793). Вкратце, потерю веса, консистенцию стула и видимую кровь в кале оценивали по шкале от 0 до 4 по степени тяжести вышеупомянутых категорий.

Проточная цитометрия.

Для анализа с помощью проточной цитометрии собственную пластинку толстой кишки выделяли из небольшого сегмента толстой кишки с использованием механического и ферментативного расщепления с помощью дезинтегратора GentleMACS™ (Miltenyi) и набора для диссоциации собственной пластинки (Miltenyi) в соответствии с инструкциями производителя. Стратегии гейтирования иммунных клеток для проточной цитометрии являются следующими:

нейтрофилы (CD45+ 7AAD-Ly6G+ CD11b+);

рекрутированные моноциты (CD45+ 7AAD-CD11b+ Ly6G-F480+ Ly6C+);

резидентные макрофаги (CD45+ 7AAD-CD11b+ Ly6G-F480+ Ly6C-).

Результаты.

Трансгенным мышам Siglec-8 либо давали нормальную питьевую воду, либо подвергали воздействию 3,5% DSS без ограничения в питьевой воде в течение 5 дней, а затем давали нормальную питьевую воду в течение дальнейших 4 дней (фиг. 1 А). Мышам, которым вводили DSS, на 2-й день после введения DSS внутрибрюшинно (IP) вводили mAb изотипического контроля или mAb против Siglec-8. Как показано на фиг. 1B, мыши, которых лечили изотипическим контролем, которые получали 3,5% DSS, демонстрировали значительную потерю массы тела, начиная со 2 дня, которая продолжалась в течение всего периода исследования, по сравнению с мышами, которые получали нормальную питьевую воду. Лечение mAb против Siglec-8 на 2 день значительно снижало вызванную DSS потерю массы тела в течение 5 дней по сравнению с мышами, обработанными изотипическим контролем, подвергавшимися воздействию DSS.

Для дальнейшего изучения того, облегчает ли лечение антителами к Siglec-8 патологию IBD, активность заболевания оценивали с использованием методологии DAI, описанной выше. Воздействие DSS значительно увеличивало DAI, начиная со 2 дня, что продолжалось на протяжении всего исследования, по сравнению с мышами, которым давали нормальную питьевую воду (фиг. 2). Лечение mAb против Siglec-8 на 2 день значительно улучшило DAI на 4 день и номинально на 6 день ($p=0,06$) по сравнению с мышами, обработанными изотипическим контролем, демонстрируя, что получение терапевтической дозы mAb против Siglec-8 снижает активность заболевания при вызванном DSS колите.

Затем исследовали вес толстой кишки. Увеличение веса толстой кишки у животных, получавших DSS, отображает увеличение воспаления толстой кишки (см. Liu, E.S. et al. (2003) Carcinogenesis 24: 1407-1413). У животных, получавших DSS+ изотипический контроль, наблюдалось значительное увеличение веса толстой кишки по сравнению с мышами, которым давали нормальную питьевую воду (фиг. 3). Лечение mAb против Siglec-8 на 2 день значительно снижало увеличение веса толстой кишки при DSS по сравнению с мышами, обработанными изотипическим контролем. Эти результаты свидетельствуют о том, что лечение mAb против Siglec-8 ингибирует воспаление толстой кишки.

Чтобы исследовать инфильтрацию иммунных клеток на модели IBD, вызванного DSS, мышей анализировали на наличие инфильтрации иммунных клеток в собственной пластинке толстой кишки с использованием проточной цитометрии, как описано выше. По сравнению с мышами, получавшими нормальную питьевую воду, у животных, получавших DSS+изотипический контроль, наблюдалось значительное увеличение провоспалительных нейтрофилов и моноцитов, а также сопутствующее снижение резидентных противовоспалительных макрофагов (фиг. 4). Лечение mAb против Siglec-8 на 2 день+воздействие DSS значительно уменьшало вызванное DSS воспаление по сравнению с животными, получавшими изотипический контроль+DSS. Мыши, получавшие mAb против Siglec-8, демонстрировали номинальное снижение провоспалительных нейтрофилов, значительное уменьшение рекрутированных моноцитов и увеличение популяции противовоспалительных резидентных макрофагов. Эти данные демонстрируют, что терапевтическое лечение mAb против Siglec-8 улучшает вызванное DSS воспаление.

Взятые вместе, эти данные показывают, что лечение антителом против Siglec-8 снижает воспаление, иммунную инфильтрацию и патологию заболевания в обоснованной мышинной модели, предполагая, что антитела к Siglec-8 могут представлять собой эффективное терапевтическое средство для лечения IBD. Кроме того, поскольку лечение антителами к Siglec-8 снижает воспаление в желудочно-кишечном тракте, лечение антителами к Siglec-8 также может быть эффективным против EGID, таких как EOE, EG, EGE и EC.

Пример 2. Результаты лечения антителами к Siglec-8 в мышинной модели эозинофильного гастроэнтерита (EGE).

Затем результаты лечения антителами к Siglec-8 исследовали в мышинной модели EGE.

Материалы и способы.

Трансгенных мышей Siglec-8 системно сенсибилизировали 100 мкг овальбумина (OVA) в квасцах с помощью внутрибрюшинной (IP) инъекции на 0 день и на 14 день с последующим внутривнутренним введением 50 мг OVA в квасцах в 28, 30, 32, 34, 36 и 39 дни (фиг. 5A). На 32 день мышам однократно IP вводили терапевтическую дозу (100 мкг/мышь) изотипически сходного контрольного антитела или mAb

против Siglec-8. Антитело к Siglec-8 представляло собой мышинное антитело 2E2 с мышинным изотипом IgG2a, то есть активным изотипом Fc, который истощает клетки, экспрессирующие Siglec-8 ("mAb против Siglec-8 2E2 IgG2a"). На 39 день исследование прекратили с последующим анализом эозинофилов крови, эозинофилов тонкого кишечника и тучных клеток методом проточной цитометрии.

Результаты.

На фиг. 5A представлена схема сенсибилизации OVA, заражения OVA и лечения антителом против Siglec-8 у трансгенных мышей Siglec-8. Результаты исследования показаны на фиг. 5B. По сравнению с мышами, получавшими изотипический контроль, мыши, получавшие mAb против Siglec-8 2E2 IgG2a, имели значительно сниженное количество эозинофилов в крови. Введение OVA значительно увеличило количество эозинофилов и тучных клеток в тонкой кишке по сравнению с лечением PBS. По сравнению с мышами, получавшими изотип, у мышей, получавших mAb против Siglec-8 2E2 IgG2a, значительно уменьшилось количество как эозинофилов, так и тучных клеток в тонкой кишке.

Эти данные демонстрируют, что лечение антителом против Siglec-8 уменьшает воспаление кишечника, которое измеряют по эозинофилам и тучным клеткам, в модели эозинофильного гастроэнтерита мыши, вызванной OVA. Эти данные предполагают, что антитела к Siglec-8 могут представлять собой эффективное терапевтическое средство для лечения EGE, как предложено в примере 1 выше.

Пример 3. Лечение антителом против Siglec-8 снижает эозинофильное желудочно-кишечное воспаление у мышей.

Активность антител к Siglec-8 тестировали в мышинной модели эозинофильного гастрита (EG) и гастроэнтерита (EGE).

Материалы и способы.

Модель воспаления при эозинофильном GI.

Как показано на фиг. 6A, трансгенных (Tg) мышей siglec-8 системно сенсибилизировали овальбумином (OVA) в течение 28 дней, после чего каждые 2 дня проводили 6 внутривенных желудочных тестов OVA (см. Song DJ, Cho JY, Miller M, et al. Anti-Siglec-F antibody inhibits oral egg allergen induced intestinal eosinophilic inflammation in a mouse model. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2009; 131(1):157-169. doi: 10.1016/j.clim.2008.11.009 и Brandt EB, Strait RT, Hershko D, et al. Тучные клетки необходимы для экспериментальной вызванной оральным аллергеном диареи. *Journal of Clinical Investigation*. 2003; 112 (11): 1666-1677. Doi: 10.1172/JCI200319785). На 32 день мышам вводили дозу (IP) mAb против Siglec-8 (mIgG2a) или изотипически сходного контрольного антитела.

Проточная цитометрия.

Ткани расщепляли, используя ферментативные и механические методы, в соответствии со стандартными процедурами. Стратегии гейтирования, используемые для эозинофилов и тучных клеток в тканях GI, показаны на фиг. 6B и 6C, соответственно. Периферическую кровь собирали в пробирки с EDTA с последующим лизисом эритроцитов.

Анализ с помощью количественной ПЦР (qPCR).

Ткань тонкой кишки измельчали и использовали для выделения РНК (Qiagen) с последующим синтезом кДНК (Applied Biosciences) и количественной оценкой транскрипта с использованием SYBR green.

Анализ цитокинов.

При завершении исследования выделяли сыворотку, и цитокины измеряли с использованием Luminex (Millipore).

Статистические данные.

Данные, представленные в столбцах, представляют средние значения по группам из 6-8 мышей. Р-значения, сравнивающие группы изотипического контроля и антитела к Siglec-8, получали с использованием U-критерия Манна-Уитни в GraphPad Prism.

Результаты.

Активность лечения антителом против Siglec-8 проверяли на мышинной модели эозинофильного гастрита (EG) и гастроэнтерита (EGE), как показано на фиг. 6A. У мышей развилась вызванная аллергеном тканевая эозинофилия в желудке и тонкой кишке после введения OVA, напоминающая EG и EGE. После окончания исследования эозинофилы анализировали в крови и тканях, тучные клетки анализировали в тканях, а цитокины анализировали в сыворотке и тканях. Предыдущая работа с использованием этой модели не показала, что инфильтрация эозинофилов будет происходить в желудке.

Лечение моноклональными антителами к Siglec-8 приводило к снижению вызванной OVA эозинофилии как в желудке (фиг. 7A), так и в тонкой кишке (фиг. 7B). Лечение mAb против Siglec-8 значительно уменьшало эозинофилию в желудке и тонкой кишке ($p < 0,05$ по сравнению с изотипическим контролем).

Мыши, получавшие mAb против Siglec-8, также демонстрировали значительно сниженную эозинофилию в MLN ($p < 0,01$ по сравнению с изотипическим контролем; фиг. 8 и 9A), что согласуется со снижением, наблюдаемым в желудке и тонкой кишке. Снижение тканевой эозинофилии у мышей, получавших mAb против Siglec-8, также было связано со значительным снижением эозинофилов в крови ($p < 0,05$ по сравнению с изотипическим контролем; фиг. 9B). Эти результаты демонстрируют, что лечение антителом против Siglec-8 снижает эозинофилию в MLN и снижает эозинофилы в крови.

В дополнение к вызванной аллергеном тканевой эозинофилии, инфильтрацию тучных клеток

также наблюдали в желудке (фиг. 10 и 11А), тонкой кишке (фиг. 11В) и MLN (фиг. 11С). Как показано на фиг. 10-11С, лечение mAb против Siglec-8 значительно уменьшало количество тучных клеток в желудке ($p < 0,01$), тонкой кишке ($p < 0,05$) и MLN ($p < 0,05$) по сравнению с изотипическим контролем. Эти результаты неожиданно продемонстрировали, что лечение mAb против Siglec-8 ингибирует инфильтрацию тучных клеток в желудке, в дополнение к тонкой кишке и MLN.

Экспрессию генов, о которых известно, что они кодируют медиаторы воспаления, вовлеченные в рекрутирование эозинофилов и тучных клеток, также анализировали в ткани тонкой кишки (фиг. 12А-12Е). У мышей наблюдалась повышенная экспрессия известных хемокинов тучных клеток и эозинофилов в тонкой кишке, что соответствовало тканевой эозинофилии, вызванной аллергенами, и повышенной инфильтрации тучных клеток. Мыши, которым вводили mAb Siglec-8, показали значительно сниженную экспрессию тучных клеток и эозинофильных хемокинов и медиаторов воспаления в тонкой кишке ($p < 0,05$ по сравнению с изотипическим контролем для каждого тестируемого гена).

Лечения mAb против Siglec-8 также значительно снижало ($p < 0,05$ по сравнению с изотипическим контролем) системные уровни CCL2 (фиг. 13А) и CXCL1 (фиг. 13В) в сыворотке. Мыши, которым вводили mAb против Siglec-8, также имели сходные уровни OVA-IgE по сравнению с мышами, получавшими изотипический контроль (фиг. 13С). Это наблюдение убедительно подтверждает вывод о том, что лечение mAb против Siglec-8 ингибирует IgE-зависимую активацию тучных клеток. Не желая привязываться к теории, тот факт, что экспрессия CCL2 как в тонкой кишке, так и в сыворотке была снижена при лечении антителом против Siglec-8, позволяет предположить, что он может найти применение в качестве биомаркера, например, для активности и/или фармакодинамики антитела к Siglec-8.

В заключение было обнаружено, что системная сенсibilизация и внутрижелудочная стимуляция с помощью OVA вызывают эозинофилию и инфильтрацию тучных клеток в желудочно-кишечном тракте, напоминая EG и EGE. Было обнаружено, что введение терапевтической дозы mAb против Siglec-8 значительно ингибирует вызванную OVA эозинофилию и накопление тучных клеток в желудке, тонкой кишке и MLN. Мыши, получавшие mAb против Siglec-8, демонстрировали значительно сниженную экспрессию гранулярных белков и медиаторов воспаления в тонкой кишке и сыворотке, но не показали измененных уровней OVA-специфического IgE в сыворотке.

Эти результаты позволяют предположить, что лечение mAb против Siglec-8 ингибирует IgE-зависимые последующие результаты. В целом, эти данные подтверждают, что эозинофилы и тучные клетки являются ключевыми компонентами EGID, и демонстрируют, что взаимодействие Siglec-8 с моноклональным антителом представляет собой новый подход к значительному снижению воспаления эозинофильных и тучных клеток GI, вызванного аллергеном.

Пример 4. Структура открытого, предварительного исследования для оценки эффективности и безопасности лечения антителами к Siglec-8 у пациентов с эозинофильным гастритом (EG), с эозинофильным гастроэнтеритом (EGE) или без него.

EG ± EGE представляет собой редкий тип эозинофильного расстройства желудочно-кишечного тракта (EGID) и характеризуется хроническим воспалением вследствие очаговой или диффузной инфильтрации эозинофилов в слою желудка (EG-EGE) или желудка и тонкой кишки (EG+EGE). Диагноз ставят на основании клинических проявлений (желудочно-кишечные симптомы) в сочетании с повышенным содержанием эозинофилов в тканях в биоптатах из желудка и двенадцатиперстной кишки без какой-либо другой причины эозинофилии. Симптомы обычно включают тошноту, рвоту, боль в животе, понос, вздутие живота, раннее чувство сытости и потерю веса.

Не существует одобренного FDA лечения EG ± EGE. Современные методы лечения и лечения заболеваний включают ингибиторы протонной помпы, ограниченные/элементарные диеты, системные или пероральные кортикостероиды, а также периодическое использование иммуномодулирующих биопрепаратов вне инструкции. Ингибиторы протонной помпы практически не приносят пользы пациентам с EG ± EGE, хотя частичная польза может наблюдаться у пациентов с эозинофильным эзофагитом (EoE). Ограниченные/элементарные диеты не считаются устойчивыми для длительного лечения и используются в большей степени для обеспечения питания, несмотря на сохраняющиеся симптомы. Кортикостероиды, системные или пероральные, могут облегчить симптомы, но не являются решением для длительного лечения из-за их многочисленных побочных эффектов. Это исследование предназначено для проверки безопасности и эффективности лечения антителом против Siglec-8 у пациентов с EG ± EGE.

В общей сложности приблизительно 60 субъектам вводили дозу в исследовании, в котором 20 субъектов получали антитело к Siglec-8 НЕКА (нефукозилированный IgG1) в дозе 0,3 мг/кг для первой дозы, за которой следовало 0,3 мг/кг для 3 последующих доз, 20 субъектов получали антитело к Siglec-8 НЕКА (нефукозилированный IgG1) в дозе 0,3 мг/кг для первой дозы, затем 1 мг/кг для 3 последующих доз, а 20 субъектов получали плацебо рандомизированным двойным слепым методом. 4 дозы антитела к Siglec-8 НЕКА (нефукозилированный IgG1) или плацебо вводили с помощью внутривенной инфузии в 1, 29 (±3), 57 (±3) и 85 (±3) день.

За пациентами наблюдали в течение 56 (±3) дней после последней дозы, а повторную эзофагогастро-дуоденоскопию (EGD) с биопсией проводили через 14 (±3) дней после введения последней дозы.

Тестировали пациентов с EG ± EGE. Опросный лист (PRO), сообщаемый пациентом, использовали для оценки признаков и симптомов, связанных с EG и EGE, и его ежедневно заполнял каждый субъект (примерно в одно и то же время каждый вечер) в течение периодов скрининга, лечения и наблюдения. Субъекты оценивают качество своей жизни, используя обследование состояния здоровья SF-36 при осмотре, предварительную дозу в 1, 29, 57 и 85 дни инфузии, а также в последующие 113 и 141 дни (или при досрочном прекращении).

Критерии включения включают:

- (a) возраст (≥ 18 и ≤ 80 лет);
- (b) предыдущий диагноз EG или EGE;
- (c) перед эндоскопией, средняя еженедельная оценка ≥ 3 (по шкале 0-10), регистрируемая для боли в животе, поноса и/или тошноты по опроснику PRO в течение по меньшей мере 2 из 3 недель сбора PRO (каждую неделю необходимо заполнять минимально четыре опросника);
- (d) эозинофилия слизистой оболочки желудка ≥ 30 эозинофилов/поле зрения под большим увеличением (HPF) в 5 анализах HPF из EGD, выполненных в течение периода скрининга, без какой-либо другой причины эозинофилии желудка (например, паразитарная или другая инфекция или злокачественная опухоль);
- (e) отсутствие или не должное регулирование стандартными методами лечения EG (которые среди прочего могут включать PPI, системные или местные кортикостероиды и/или диету);
- (f) если при другом лечении EG, EGE или EoE при включении в исследование были стабильная доза в течение по меньшей мере 8 недель перед скринингом и готовность продолжать прием этой дозы в течение всего исследования (только 4 недели перед скринингом в течение ингибитора протонной помпы (PPI)); и

(g) отрицательный тест на беременность (женщины).

Критерии исключения включают:

- (a) диагноз глютеиновой болезни или инфекции *H. pylori*, что определяют при скрининге EGD или глютеиновой болезни в анамнезе, диагностированной перед EGD;
- (b) злокачественное новообразование в анамнезе; за исключением карциномы *in situ* в шейке матки, ранней стадии рака предстательной железы или немеланомного рака кожи (в исследование можно включать при раке, который находится в состоянии ремиссии в течение более 5 лет и считается вылеченным, за исключением рака молочной железы);
- (c) лечение химиотерапией или радиотерапией за последние 6 месяцев;
- (d) лечение вызванной гельминтами паразитарной инфекции в пределах 6 месяцев от скрининга и/или положительный паразитарный/Ova тест при скрининге;
- (e) использование в течение 30 дней перед скринингом (или 5 периодов полураспада, в зависимости от того, что дольше) или использование во время периода скрининга любых лекарств, которые могут помешать исследованию, таких как иммунодепрессанты или иммуномодуляторы (включая азатиоприн, 6-меркаптопурин, метотрексат, циклоспорин, такролимус, рецептор против TNF, против IL-5, против IL-5, дупилумаб, антитела к IgE, омализумаб) или системные кортикостероиды с суточной дозой >10 мг преднизона или аналога;
- (f) вакцинация живыми ослабленными вакцинами в течение 30 дней до начала лечения в исследовании, в течение периода лечения или вакцинация, ожидаемая в течение 5 периодов полувыведения (4 месяца) после введения исследуемого лекарственного средства; и
- (g) участие в конкурентном интервенционном исследовании с последним вмешательством, имевшим место в течение 30 дней до введения исследуемого препарата (или 90 дней или 5 периодов полураспада, в зависимости от того, что дольше, для биологических продуктов).

Первичным критерием оценки является изменение количества эозинофилов в поле зрения при большом увеличении (HPF) при биопсии желудка до и после лечения антителом против Siglec-8 по сравнению с лечением плацебо.

Вторичный критерий оценки включает изменение следующих параметров перед и после лечения антителом против Siglec-8 по сравнению с лечением плацебо:

- (a) изменения симптомов EG и EGE в анкете пациента (PRO) с результатами лечения (к числу симптомов относятся боль в животе, тошнота, рвота, понос, ранняя сытость, потеря аппетита, вздутие живота и спазмы в животе);
- (b) изменение качества жизни, измеренное с помощью краткого опросника по оценке состояния здоровья из 36 пунктов;
- (c) изменение количества эозинофилов в крови;
- (d) изменение количества эозинофилов в HPF при биопсии пищевода и двенадцатиперстной кишки у пациентов с сопутствующим EoE и/или EGE, соответственно;
- (e) изменение морфологической оценки биопсии желудка и двенадцатиперстной кишки до и после лечения (с использованием шкалы по сиднейской системе);
- (f) изменение тучных клеток (триптаза-положительных клеток) в HPF при биопсии желудка и/или

двенадцатиперстной кишки, соответственно;

(g) изменение массы тела; и

(h) изменение доли пациентов с гистологической ремиссией, определяемой как <30 эозинофилов/HPF в 5 HPF, при биопсии желудка.

Цели исследования включают сравнение следующих показателей у пациентов, получавших антите-ло к Siglec-8, по сравнению с лечением плацебо:

(1) морфологическая оценка биопсии желудка и двенадцатиперстной кишки до и после лечения с использованием шкалы по сиднейской системе;

(2) изменение тучных клеток (например, триптазоположительных клеток) в HPF при биопсии же-лудка и/или двенадцатиперстной кишки;

(3) изменение массы тела; и

(4) доля пациентов с гистологической ремиссией, определяемой как <30 эозинофилов/HPF в 5 HPF при биопсии желудка.

Фармакодинамические (PD) конечные точки включают изменение по сравнению с исходным уров-нем количества эозинофилов в слизистой оболочке пищевода и/или двенадцатиперстной кишки у паци-ентов с сопутствующим EoE и/или EGE и количеством эозинофилов в крови (абсолютное).

Последовательности

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

Все последовательности нуклеиновых кислот представлены 5'-3', если не отмечено иное.

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи мышечного 2E2

QVQLKESGPGLVAPSQSLTITVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAG
GSTNYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKINSLQTTDALTALYYCARDGSSPYYSMEYWGQ
GTSVTVSS (SEQ ID NO:1)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2 RHA

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYSMEYW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:2)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2 RHB

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWLGVIWA
GGSTNYNSALMSRLSISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYSMEYW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:3)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2 RHC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYSMEYW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:4)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2 RHD

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWLSVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYSMEYW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:5)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2 RHE

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYSMEYW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:6)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2 RHF

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWA
GGSTNYNSALMSRLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYW
GQGTDTVSS (SEQ ID NO:7)

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи 2E2 RHG

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWA
GGSTNYNSALMSRFSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYW
GQGTDTVSS (SEQ ID NO:8)

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи 2E2

RHA2

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISYGAHWIRQPPGKGLEWIGVIWAGG
STNYNSALMSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQG
TLVTVSS (SEQ ID NO:9)

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи 2E2

RHB2

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAG
GSTNYNSALMSRLSISKDNSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQ
GTLVTVSS (SEQ ID NO:10)

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYGMEYW
GQGTDTVSS (SEQ ID NO:11)

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи 2E2 RHE

E-D

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMDYW
GQGTDTVSS (SEQ ID NO:12)

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи 2E2 RHE

Y-V

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEVW
GQGTDTVSS (SEQ ID NO:13)

Аминокислотная последовательность тройного мутантного варибельного домена тяжелой цепи 2E2 RHE

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYGMDVW
GQGTDTVSS (SEQ ID NO:14)

Аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи мышинового 2E2

QIILTQSPAIMASAPGEEKVSITCSATSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASG
VPVRFSGSGSGTYSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:15)

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи 2E2 RKA

EIVLTQSPATLSLSPGEEKPYICALSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLA
SGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID
NO:16)

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи 2E2 RKB

EIILTQSPATLSLSPGEEKPYICALSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLWIYSTSNLA
SGVPARFSGSGSGTDYTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID
NO:17)

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи 2E2 RKC

EIILTQSPATLSLSPGEEKPYICALSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLA
SGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID
NO:18)

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи 2E2 RKD

EIVLTQSPATLSLSPGEEKPYICALSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLWIYSTSNL
ASGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID
NO:19)

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи 2E2 RKE

EIVLTQSPATLSLSPGEEKPYICALSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLA
SGVPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID
NO:20)

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи 2E2 RKF

EIVLTQSPATLSLSPGEEKPYICALSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLA
SGIPARFSGSGSGTDYTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID
NO:21)

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи 2E2 RKG

EIVLTQSPATLSLSPGEEKPYICALSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNL
ASGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID
NO:22)

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

EIVLTQSPATLSLSPGEEKPYICALSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLA
SGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID
NO:23)

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

EIVLTQSPATLSLSPGEEKPYICALSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLA
SGIPARFSGSGSGTDYTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID

NO:24)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи НЕКА и тяжелой цепи НЕКФ

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYSMEYW
GQGTTVTVSSastkgpsvflapssksts ggtaalglvkdypfpvvtvswngalts gvhthfpavlqssglyslssvvtvpsssl
gtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmi srtpvctvvdvshedpevkfnwyvd
gvevhna ktpreeqynstyrvsvtlvhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvs tcl
vkgfypsдиаvewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdkrsrwqqgnvfscsvmhealhnhytqksls spg (SEQ ID
NO:75)

Аминокислотная последовательность легкой цепи НЕКА

EIVLTQSPATLSLSPGEKPYICALSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTNLA
SGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIKrtvaapsvfifppsd
qlksgtasvcllnfyreakvqwkvДНКlqsgnsqesvteqdskdstyslstltsка красительkhkvyacevthqglssp
vtksfnrgec (SEQ ID NO:76)

Аминокислотная последовательность легкой цепи НЕКФ

EIVLTQSPATLSLSPGEKPYICALSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTNLA
SGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIKrtvaapsvfifppsd
eqlksgtasvcllnfyreakvqwkvДНКlqsgnsqesvteqdskdstyslstltsка красительkhkvyacevthqglss
pvtksfnrgec (SEQ ID NO:77)

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1

astkgpsvflapssksts ggtaalglvkdypfpvvtvswngalts gvhthfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnv
nhkpsntkvdkrvepkscdkthtppcpapellggpsvflfppkpkdtlmi srtpvctvvdvshedpevkfnwyvdgvevhna
ktpreeqynstyrvsvtlvhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvs tclvkgfyps
диаvewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdkrsrwqqgnvfscsvmhealhnhytqksls spg (SEQ ID NO:78)

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG4

astkgpsvflapcsrsts estaalglvkdypfpvvtvswngalts gvhthfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnv
dhkpsntkvdkrveskygppcpapeflggpsvflfppkpkdtlmi srtpvctvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhna ktp
preeqfnstyrvsvtlvhqdwlngkeykckvsnkglpssiiektiskakgqprepvytlppsreemtknqvs tclvkgfypsдиа
vewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdkrsrwqqgnvfscsvmhealhnhytqksls slg (SEQ ID NO:79)

Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи каппа Ig

rtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnfyreakvqwkvДНКlqsgnsqesvteqdskdstyslstltsка краси
тельkhkvyacevthqglsspvtksfnrgec (SEQ ID NO:80)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи мышиноного 2C4 и 2E2 IgG1

QVQLKRASGPGLVAPSQSLTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWA
GGSTNYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKINSLQTDALYYCARDGSSPYYSMEYWG
QGTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGV
HTFPAVLES DLYTLSSSVTVPSRPRSETVTCNVAHIPOXODYATKVDKIVPRDCGCKP
CICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQ
PREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI

PPPKEQMAKDKVSLT
 CMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFT
 CSVLHEGLHNHHTKSLSHSPG (SEQ ID NO:81)

Аминокислотная последовательность легкой цепи каппа мышиноного 2C4

EIILTQSPAIMASAPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASG
 VPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKADAAPTVSIFP
 PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDQSKDSTYSMSST
 LTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRENC (SEQ ID NO:82)

Аминокислотная последовательность легкой цепи каппа мышиноного 2E2

QIILTQSPAIMASAPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASG
 VPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKADAAPTVSIFP
 PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDQSKDSTYSMSST
 LTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRENC (SEQ ID NO:83)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи химерного 2C4 и 2E2 IgG1

QVQLKRASTGASGLVAPSSQSLITCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLVGIWA
 GGSTNYNSALMSRLSISKDNSKQVFLKINSLQTDALYYCARDGSSPYYSMEYWG
 QGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCKDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG (SEQ ID NO:84)

Аминокислотная последовательность легкой цепи каппа химерного 2C4

EIILTQSPAIMASAPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASG
 VPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDQSKDSTYSLSS
 TLTLTKAKRACITELKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:85)

Аминокислотная последовательность легкой цепи каппа химерного 2E2

QIILTQSPAIMASAPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASG
 VPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDHKLQSGNSQESVTEQDQSKDSTYSLSS
 TLTLTKAKRACITELKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:86)

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGIWA
 GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYSMEYW
 GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP
 APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT

KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLG (SEQ ID NO:87)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи
мышинного 1C3 (подчеркнутые остатки содержат CDR H1 и H2 согласно нумерации Chothia)

EVQVVESGGDLVKS^{GG}SLKLS^{CAAS}GF^{PFSS}Y^{AM}SWVRQTPDKRLEWVAI^{SSG}
G^{SY}TY^YSDSVKGRFTISR^{ДН}К^КNTLYLQ^{MS}SLK^{SE}DTAM^YYCARHETAQA^{AW}FAYWG
QGTLLTVSA (SEQ ID NO:106)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи
мышинного 1H10 (подчеркнутые остатки содержат CDR H1 и H2 согласно нумерации
Chothia)

EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDY^{MY}WVKQRPEQGLEWIGRI^{AP}E
DGDTEYAPK^{FQ}GKATVTADTSSNTAYLHLS^{SL}TSED^{TA}VYYCTEGNYYGSSILDYWG
QGTLLTVSS (SEQ ID NO:107)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи
мышинного 4F11 (подчеркнутые остатки содержат CDR H1 и H2 согласно нумерации
Chothia)

QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGY^{AF}RSSW^{MN}WVKQRPGKLEWIGQI^{YP}
G^{DD}Y^TNYNGK^FGK^VTLTADR^{SS}STAYMQL^{SSL}TSE^{DS}AVYFCARLGPY^{GP}FADWGQ
GTLVTVSA (SEQ ID NO:108)

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи мышинного
1C3

QIVLTQSPA^{IM}SASPGEKVTMTCSASSSVSY^{MH}WYQ^QKS^{GT}SPKRWIYDTSKLA
YGV^{PAR}FSGSGSGT^{YS}SLTISS^{ME}AEDAAT^YYCCQ^WSSNP^{TF}GGG^TKLEIK (SEQ ID
NO:109)

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи мышинного
1H10

DIQMTQT^TSSLSASL^{GDR}VTISCRASQDIT^{NY}LNWYQ^QKPD^{GT}VKLLIY^{FT}SR^{LH}S
GV^{PS}R^FS^GS^GSGT^{DY}SLTISNLEQ^{ED}IAT^YFC^QQ^{GN}TL^{PW}TFGGG^TKLEIK (SEQ ID
NO:110)

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи мышинного
4F11

QIVLTQSPA^{IV}SASPGEKVTMTCSASSSVSY^{MY}WYQ^QRPG^{SS}PRLLIY^{DT}SSLASG
VP^{VR}F^SG^SG^SSGT^{YS}SLTIS^{RIE}SEDAAN^YYCCQ^WNSD^{PY}TFGGG^TKLEIK (SEQ ID
NO:111)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или профилактики эозинофильного расстройства желудочно-кишечного тракта (EGID) у индивидуума, причем указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека; причем у индивидуума имеется эозинофильный гастрит (EG), эозинофильный гастроэнтерит (EGE) или эозинофильный колит (EC).

2. Способ по п.1, в котором у индивидуума имеется два или более, или все три из EG, EGE и EC.

3. Способ по п.1, в котором у индивидуума имеется EGE и EG.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором у индивидуума имеется эозинофилия периферической крови; и/или

причем у индивидуума имеется повышенное количество тучных клеток, нейтрофилов, эозинофилов и/или лимфоцитов по меньшей мере в части желудочно-кишечного тракта по сравнению с индивидуумом без EGID.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором у индивидуума имеется повышенная эозинофильная инфильтрация по меньшей мере в части желудочно-кишечного тракта по сравнению с индивидуумом без EGID.

6. Способ по п.5, в котором в образце, полученном из желудочно-кишечного тракта индивидуума, имеется 15 или более эозинофилов в поле зрения при большом увеличении (HPF);

причем в образце, полученном из желудочно-кишечного тракта индивидуума, имеется в среднем 15

или более эозинофилов в поле зрения при большом увеличении (HPF) в двух или более HPF;

причем в образце, полученном из желудочно-кишечного тракта индивидуума, имеется пиковое количество эозинофилов, составляющее 50 или более эозинофилов в поле зрения при большом увеличении (HPF) в двух или более HPF;

причем в образце, полученном из желудочно-кишечного тракта индивидуума, имеется по меньшей мере пять измерений в поле зрения при большом увеличении (HPF), в каждом из которых имеется количество эозинофилов, равное 30 или более эозинофилов на HPF; или

причем в каждом из по меньшей мере пяти образцов, полученных из желудочно-кишечного тракта индивидуума, имеется количество эозинофилов, равное 30 или более эозинофилов в поле зрения при большом увеличении (HPF).

7. Способ по п.6, в котором образец или по меньшей мере пять образцов берут из биопсии желудка.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором в образце периферической крови, полученном у индивидуума, имеется 200 или более эозинофилов на мкл и/или повышенная экспрессия CCL2 по сравнению с эталонным значением для экспрессии CCL2.

9. Способ по любому из пп.1-8, в котором:

(a) один или более симптом (симптомов) у индивидуума с EGID уменьшаются по сравнению с базовым уровнем перед введением композиции;

(b) одно или более из боли в животе, дисфагии, затрудненного прохождения пищи, рвоты, изжоги, тошноты, отсутствия прибавки в весе, проблем с питанием, диспепсии, потери веса, поноса, желудочно-кишечной непроходимости, желудочно-кишечного кровотечения, асцита, мальабсорбции, анемии, энтеропатии с потерей белка, утолщения толстой кишки и непроходимости толстой кишки у индивидуума уменьшаются по сравнению с базовым уровнем перед введением композиции;

(c) количество эозинофилов в поле зрения при большом увеличении (HPF) в образце, полученном из желудочно-кишечного тракта индивидуума, уменьшается по сравнению с базовым уровнем перед введением композиции; или

(d) экспрессия уменьшается по сравнению с базовым уровнем перед введением композиции.

10. Способ по п.9, в котором образец берут из биопсии желудка.

11. Способ по любому из пп.1-10, в котором композицию вводят путем внутривенной инфузии или подкожной инъекции.

12. Способ по любому из пп.1-11, в котором антитело содержит Fc-область и N-гликозид-связанные углеводные цепи, связанные с Fc-областью, причем менее чем 50% N-гликозид-связанных углеводных цепей антитела в композиции содержат фукозный остаток; и при этом необязательно по существу ни одна из N-гликозид-связанных углеводных цепей антитела в композиции не содержит фукозный остаток.

13. Способ по любому из пп.1-12, в котором:

(a) антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и/или при этом вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66.

(b) антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и (iii) HVR-H3, содержащий аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 67-70; и/или при этом вариабельная область легкой цепи содержит

(i) HVR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71;

(c) антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 16 или 21;

(d) антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 11-14; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 23-24;

(e) антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 2-14; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 16-24;

(f) антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 2-10; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбираемую из SEQ ID NO: 16-22;

(g) антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: HC-FR1, содержащий

NO: 108; и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111;

(p) антитело связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 не являющегося человеком примата, причем необязательно антитело связывается с эпитопом в домене 1 Siglec-8 человека, содержащем аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112, с эпитопом в домене 3 Siglec-8 человека, содержащем аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114, или с тем же эпитопом, что и антитело 4F11;

(q) антитело связывается с эпитопом в домене 2 или домене 3 Siglec-8 человека, причем необязательно домен 2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113, антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело 1C3, домен 3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114, или антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело 1H10;

(r) антитело связывается с эпитопом в домене 1 Siglec-8 человека и конкурирует с антителом 4F11 за связывание с Siglec-8, причем необязательно антитело не конкурирует с антителом 2E2 за связывание с Siglec-8 или не является антителом 2E2; или

(s) антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность или SEQ ID NO: 76 или 77.

14. Способ по п.13, в котором антитело представляет собой человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело; или при этом антитело сконструировано для улучшения антитело-зависимой опосредованной клетками цитотоксической (ADCC) активности.

15. Способ по п.13 или 14, в котором:

- (a) антитело истощает эозинофилы крови и ингибирует активацию тучных клеток;
- (b) антитело содержит Fc-область тяжелой цепи, представляющую собой область человека;
- (c) по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела не фукозилированы; и/или
- (d) антитело представляет собой моноклональное антитело.

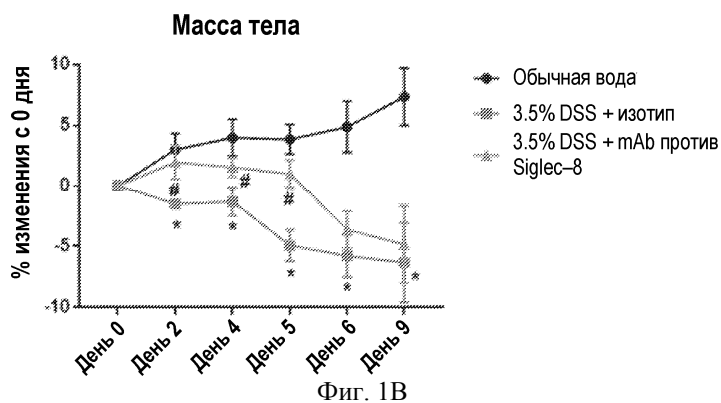
16. Способ по п.15, в котором Fc-область представляет собой нефукозилированную Fc-область человеческого IgG1, или область человеческого IgG4, содержащую аминокислотную замену S228P, причем аминокислотные остатки нумеруют в соответствии с индексом ЕС согласно Kabat.

17. Способ по любому из пп.1-16, в котором композицию вводят в комбинации с одним или более дополнительным терапевтическим средством (средствами) для лечения или профилактики EGID.

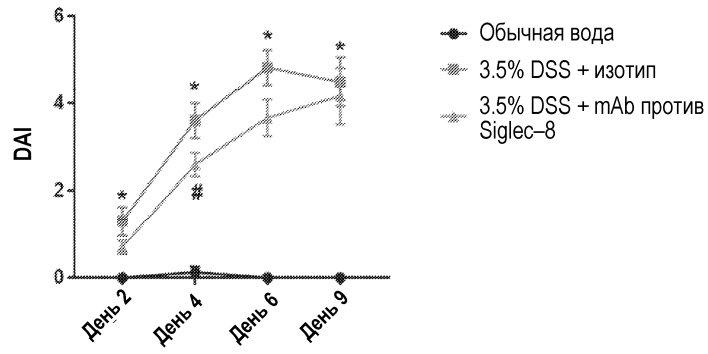
18. Способ по п.17, в котором одно или более дополнительное терапевтическое средство (средства) для лечения или профилактики EGID выбирают из группы, состоящей из кортикостероида, ингибитора лейкотриена, антигистамина, хромогликата натрия, ингибитора протонной помпы (PPI) и сульфасалазина.

19. Способ по любому из пп.1-18, в котором индивидуумом является человек.

20. Способ по любому из пп.1-19, в котором композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую антитело и фармацевтически приемлемый носитель.

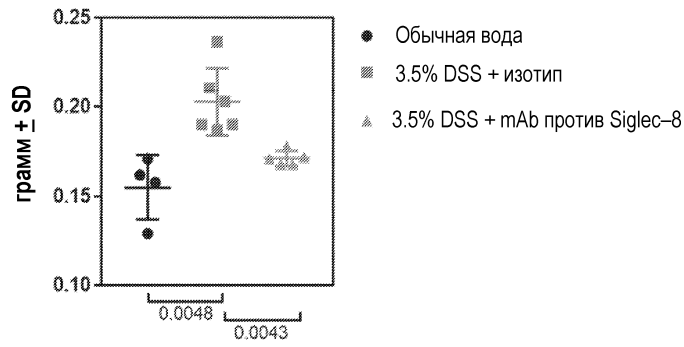


Индекс активности заболевания (DAI)



Фиг. 2

Масса толстой кишки

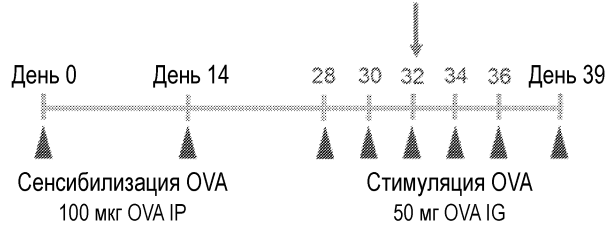


Фиг. 3

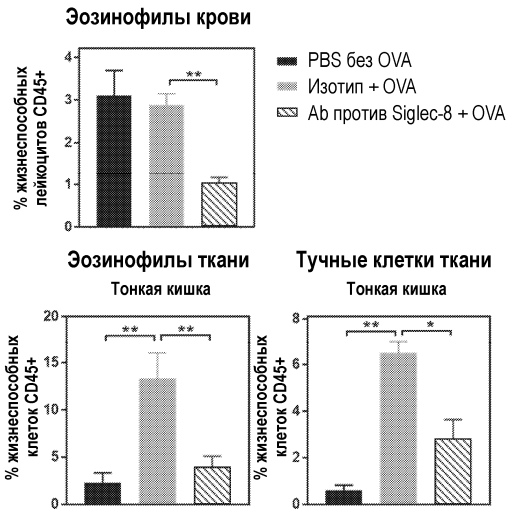


Фиг. 4

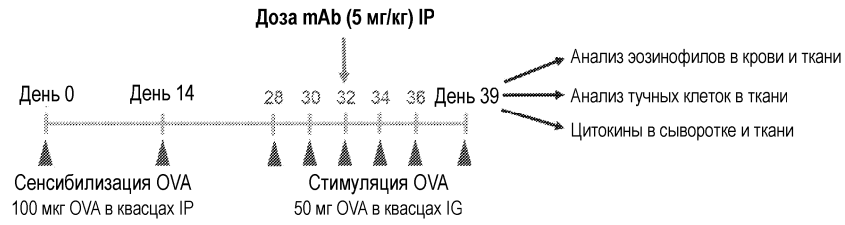
Доза mAb против Siglec-8



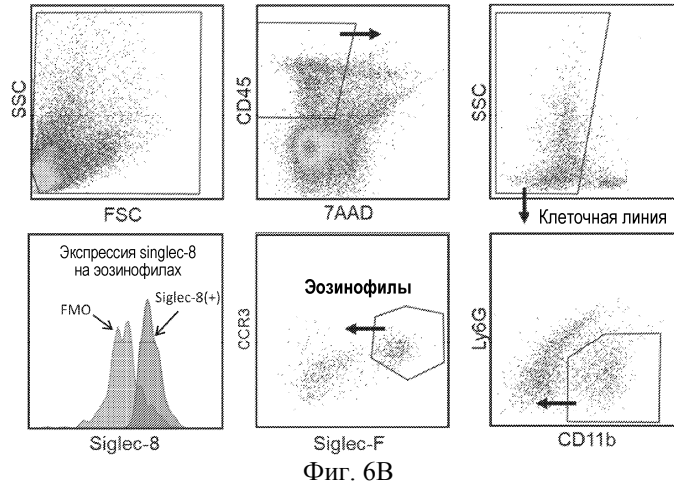
Фиг. 5A



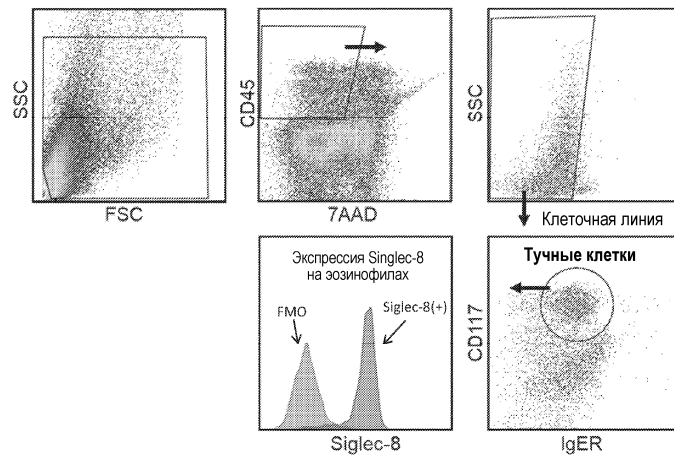
Фиг. 5В



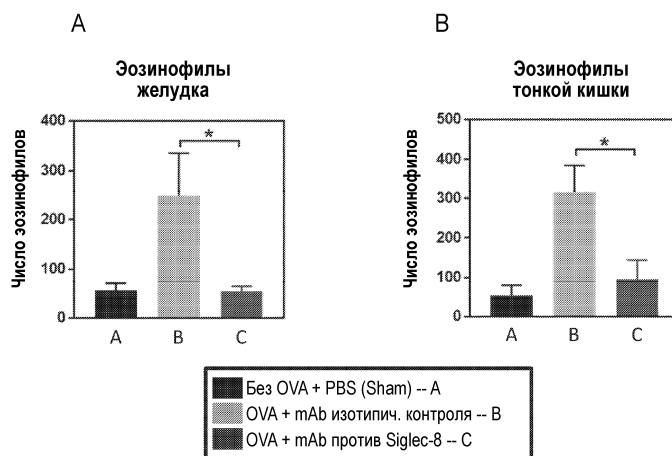
Фиг. 6А



Фиг. 6В



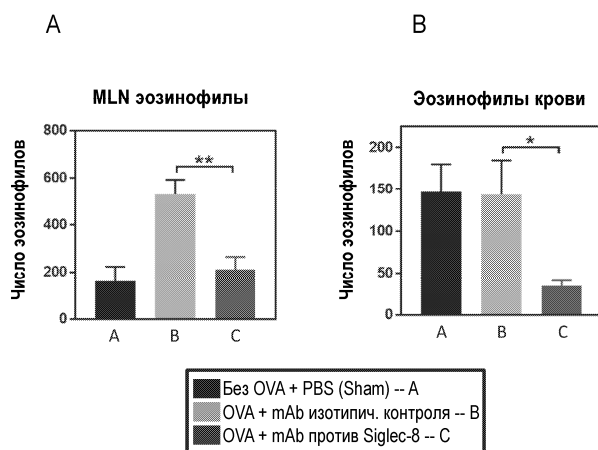
Фиг. 6С



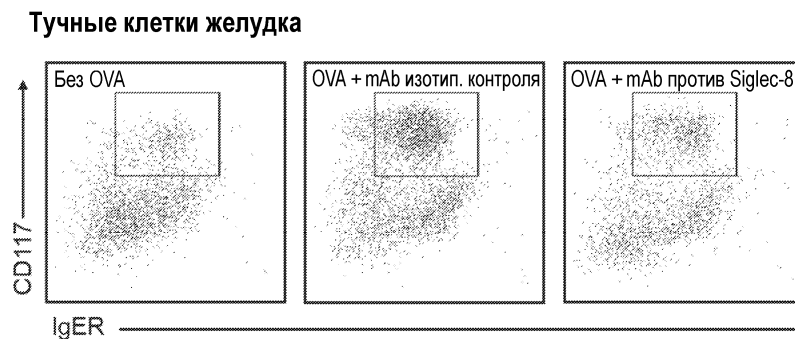
Фиг. 7



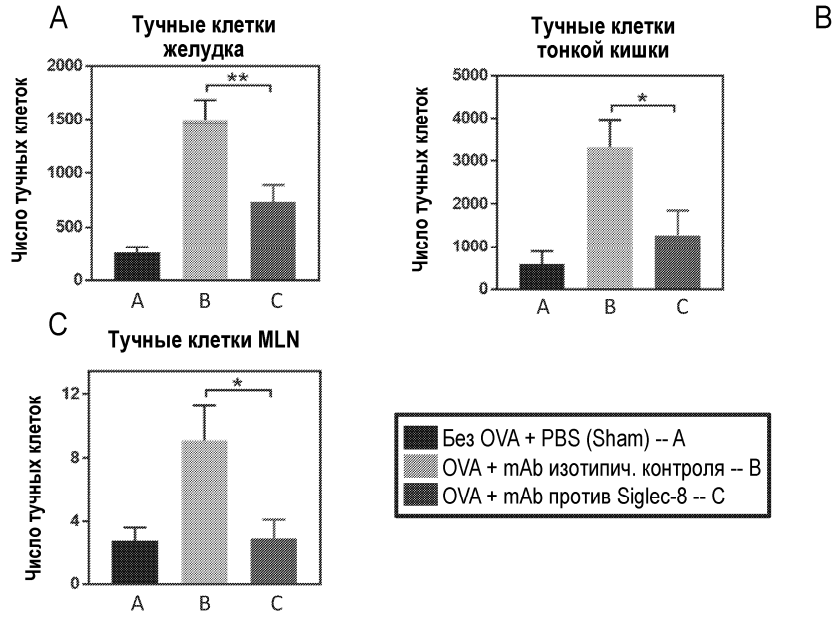
Фиг. 8



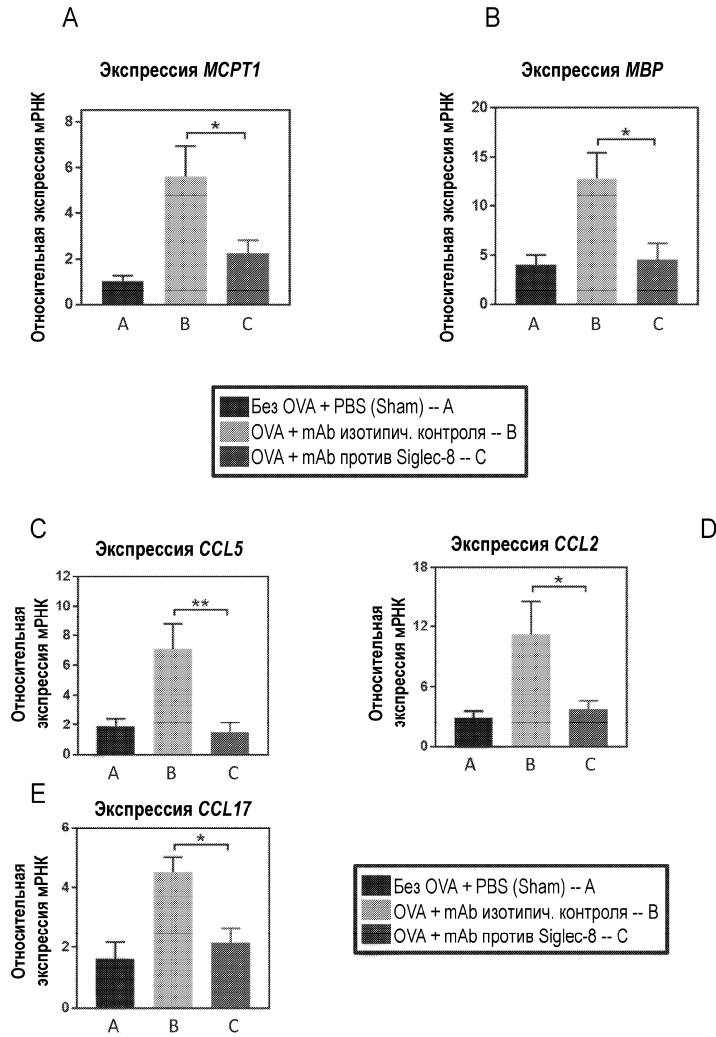
Фиг. 9



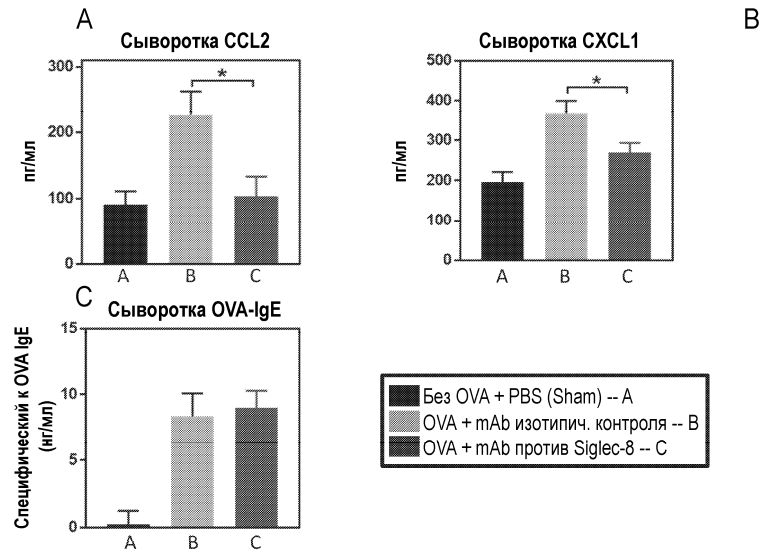
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13