

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047651**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.08.20**

(21) Номер заявки  
**202092477**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.04.12**

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)  
**A61P 11/00** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

---

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ ГАЛЕКТИНА-10**

---

(31) **1806099.6; 1901648.4**

(32) **2018.04.13; 2019.02.06**

(33) **GB**

(43) **2021.03.29**

(86) **PCT/EP2019/059570**

(87) **WO 2019/197675 2019.10.17**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**АРДЖЕНКС БВ; ВИБ ВЗВ;  
УНИВЕРСИТЕЙТ ГЕНТ (BE)**

(72) Изобретатель:  
**Ламбрехт Барт, Саввидес Саввас,  
Хаммад Хамида, Верстрате Кеннет,  
Персье Жан-Мишель, Бланхетот  
Кристоф, Сондерс Майкл (BE), Де  
Хард Ханс (NL), Ван Дер Вонинг Бас,  
Перссон Эмма (BE)**

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

(56) STEVEN J. ACKERMAN ET AL.: "Charcot-Leyden Crystal Protein (Galectin-10) Is Not a Dual Function Galectin with Lysophospholipase Activity but Binds a Lysophospholipase Inhibitor in a Novel Structural Fashion", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 17, 7 February 2002 (2002-02-07), pages 14859-14868, XP55594773, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M200221200 abstract  
CN-A-106645752

---

(57) Изобретение относится к антагонистам, а в частности, к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с белком галектином-10, а в частности, с человеческим галектином-10. Антагонисты галектина-10 нарушают кристаллизацию галектина-10 и, следовательно, могут быть использованы в способах профилактики и лечения заболеваний и состояний, при которых патология ассоциируется с образованием/присутствием кристаллов Шарко-Лейдена (CLC).

---

**B1**

**047651**

**047651**

**B1**

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к антагонистам, а в частности, к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с белком галектином-10, а в частности, с человеческим галектином-10. Антагонисты галектина-10, а в частности, антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению, нарушают кристаллизацию галектина-10, и следовательно, могут быть использованы в способах профилактики и лечения заболеваний и состояний, при которых патология ассоциируется с образованием/присутствием кристаллов Шарко-Лейдена (CLC).

### Предпосылки создания изобретения

Кристаллы Шарко-Лейдена (CLC) были впервые описаны в 1853 году и представляют собой микроскопические бесцветные кристаллы, обнаруживаемые у пациентов с определенными состояниями, включая аллергическую астму и паразитарные инфекции. CLC часто наблюдаются в тканях и секретах человека в случае эозинофильной воспалительной реакции. Помимо астмы и паразитарных инфекций, эти кристаллы были обнаружены у пациентов с раком, например, с миелоидным лейкозом. По своей структуре, CLC накапливаются в виде внеклеточных гексагональных бипирамидных кристаллов длиной 20-40 мкм и шириной 2-4 мкм. Белок, образующий эти кристаллы, был идентифицирован как галектин-10.

Галектин-10 (также известный как белок кристаллов Шарко-Лейдена) представляет собой небольшой (16,5 кДа) гидрофобный гликан-связывающий белок, экспрессируемый в больших количествах в костном мозге, в основном, эозинофилами (Chua et al. (2012) PLoS One. 7(8):e42549). Галектин-10 также продуцируется, но в меньшей степени, базофилами и Foxp3-позитивными Treg (Kubach et al. (2007) Blood 110(5): 1550-8). Этот белок является одним из наиболее распространенных компонентов эозинофилов и составляет 7-10% от общего клеточного белка. Галектин-10 обнаруживается только у людей, у которых отсутствует сигнал секреции пептидов и трансмембранный домен и секретируется при определенных условиях по неклассическим и новым апокринным механизмам.

Несмотря на многочисленные сообщения, указывающие на появление CLC в тканях пациентов с эозинофильными расстройствами, существует мнение, что эти кристаллы являются всего лишь маркером гибели эозинофилов.

### Сущность изобретения

Функция галектина-10 *in vivo* и большое количество образующихся CLC "ускользают от надзора", особенно потому, что мыши не несут ген LGALS10, кодирующий галектин-10. В настоящем изобретении показано, что кристаллы галектина-10 могут вызывать провоспалительный ответ *in vivo*, и каким образом этот ответ может подавляться введением антител к галектину-10, способных нарушать кристаллизацию галектина-10. В настоящем изобретении сообщается, как антитела к галектину-10 и их антигенсвязывающие фрагменты, включая IgG, антитела с VHH и Fab, могут предотвращать кристаллизацию галектина-10, а также растворять уже существующие кристаллы галектина-10. Важно отметить, что антитела к галектину-10 способны растворять CLC, выделенные из образцов слизи пациента. В целом, это продемонстрировало, каким образом агенты, нацеленные на кристаллизацию галектина-10, могут быть использованы для лечения состояний и расстройств, при которых патология связана с присутствием CLC.

В своем первом аспекте, настоящее изобретение относится к антагонисту, который связывается с галектином-10, где антагонист связывается с эпитопом галектина-10 и таким образом экранирует пограничный слой упаковки кристаллов галектина-10. Антагонист предпочтительно связывается с человеческим галектином-10. Настоящее изобретение также относится к антагонисту, который связывается с галектином-10, и который, при его связывании с растворимым галектином-10, ингибирует кристаллизацию галектина-10. Настоящее изобретение также относится к антагонисту, который связывается с галектином-10, и который, при его связывании с кристаллическим галектином-10, способствует растворению кристаллического галектина-10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонисты, которые связываются с галектином-10 и тем самым экранируют пограничный слой упаковки кристаллов галектина-10, ингибируют кристаллизацию галектина-10, если они связаны с растворимым галектином-10. Альтернативно или дополнительно, антагонисты галектина-10, если они связываются с кристаллическим галектином-10, могут способствовать растворению кристаллического галектина-10.

Антагонисты согласно изобретению предпочтительно связываются с человеческим галектином-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим одну или более аминокислот пограничных слоев упаковки кристаллов галектина-10, а предпочтительно человеческого галектина-10. Указанный эпитоп может содержать одну или более, две или более, три или более, четыре или более, пять или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из: Ser2, Leu3, Leu4, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Ala12, Ser13, Thr16, Thr42, Glu43, Met44, Lys45, Asp49, Ile50, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Leu96, Pro97, Asp98, Lys99, Gln101, Met103, Gly106, Gln107, Ser108, Ser109, Tyr110, Thr111, Asp113, His114, Arg115, Ile116, Lys117, Ala120, Gln125, Thr133, Lys134, Phe135, Asn136, Val137, Ser138, Tyr139, Leu140 и Lys141. Аминокислотные остатки или положения галектина-10 определены со ссылкой на последовательность человеческого белка, идентифицированную здесь как SEQ ID NO: 141.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержа-

щим Tyr69, или с эпитопом, содержащим аминокислоту, смежную с Tyr69. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим Tyr69. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим Glu68, Tyr69 и Gly70, где положения аминокислот указаны со ссылкой на SEQ ID NO: 141. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим аминокислоты Thr42, Glu43, Lys45, Asp49, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, His114, Arg115, Ile116, Lys117 и Ala120. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим аминокислоты Thr42, Glu43, Lys45, Asp49, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, His114, Arg115, Ile116, Lys117, Glu119, Ala120 и Lys122. Эпитоп может дополнительно включать Gln74 и/или Asp98. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим Glu33, Gly59, Arg60 и Lys79. Эпитоп может дополнительно включать Gln74, Gln75 и Glu77. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эпитоп содержит или состоит из Leu31, Glu33, Gly59, Arg60, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Pro82 и Gln84. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эпитоп содержит или состоит из Glu33, Gly59, Arg60, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Pro82 и Ser109. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эпитоп содержит или состоит из Glu33, Gly59, Arg60, Trp72, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Lys79, Asn80, Met81, Pro82, Gln84 и Ser109. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эпитоп содержит или состоит из Glu33, Gly59, Arg60, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Pro82, Phe83, Gln84. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эпитоп содержит или состоит из Thr42, Asp49, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, Arg115, Ile116, Lys117, Glu119 и Ala120. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эпитоп содержит или состоит из Glu43, Asp49, Glu68, Tyr69, Lys73, Asp98, Asp113, His114, Arg115, Lys117, Glu119 и Ala120. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эпитоп содержит или состоит из Asp49, Glu68, Tyr69, Lys73, Gln74, Asp98, Asp113, His114, Arg115, Ile116 и Lys117. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эпитоп содержит или состоит из Ser2, Leu3, Leu4, Pro5, Pro7, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Lys23, Arg25, Met44, Gly86, Gln87, Glu88, Phe89, Glu90, Asn105, Gln125, Thr133, Lys134 и Phe135. Аминокислотные положения галектина-10 определены со ссылкой на последовательность человеческого белка, идентифицированную в данном документе как SEQ ID NO: 141.

Антагонист галектина-10 может связываться с эпитопом, состоящим из аминокислот пограничных слоев упаковки кристаллов галектина-10. В таких вариантах осуществления изобретения, эпитоп может состоять из одной или более, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из: Ser2, Leu3, Leu4, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Ala12, Ser13, Thr16, Thr42, Glu43, Met44, Lys45, Asp49, Ile50, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Leu96, Pro97, Asp98, Lys99, Gln101, Met103, Gly106, Gln107, Ser108, Ser109, Tyr110, Thr111, Asp113, His114, Arg115, Ile116, Lys117, Ala120, Gln125, Thr133, Lys134, Phe135, Asn136, Val137, Ser138, Tyr139, Leu140 и Lys141. Аминокислотные положения галектина-10 определены со ссылкой на последовательность человеческого белка, идентифицированную в данном документе как SEQ ID NO: 141.

Альтернативно или дополнительно, антагонист может связываться с эпитопом, содержащим одну или более аминокислот из пограничного слоя димеризации галектина-10. В таких вариантах осуществления изобретения, антагонист может связываться с эпитопом, содержащим одну или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из: Pro5, Pro7, Leu27, Ala28, Cys29, Leu31, Asn32, Glu33, Pro34, Tyr35, Gln37, His41, Glu46, Glu47, Gln55, Arg60, Arg61, Arg67, Trp72, Gln75, Trp127, Arg128 и Asp129.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонист представляет собой небольшую молекулу, ингибирующий полипептид или антитело-миметик. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, антагонист представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как определено в настоящем изобретении. Антитело может представлять собой иммуноглобулин, предпочтительно иммуноглобулин класса IgG, а более предпочтительно IgG1. Антитело может представлять собой антитело с VHH. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой гуманизованный или зародышевый вариант нечеловеческого антитела, например верблюжьего антитела. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать домен CH1, шарнирную область, домен CH2 и/или домен CH3 человеческого IgG, в предпочтительно IgG1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из варибельного домена легкой цепи (VL) антитела; варибельного домена тяжелой цепи антитела (VH); одноцепочечного антитела (scFv); фрагмента F(ab')<sub>2</sub>; фрагмента Fab; фрагмента Fd; фрагмента Fv; одноцепочечного (одновалентного) антитела; диаантител, триантител, тетраантител или любой антигенсвязывающей молекулы, образованной комбинацией, сборкой или конъюгированием таких антигенсвязывающих фрагментов. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab.

В других своих аспектах, настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с галектином-10. Эти антитела можно определять исключительно по их структурным свойствам, описанным ниже. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат варибельный домен тяжелой цепи (VH) и вари-







SEQ ID NO: 164; HCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 163; LCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 182; LCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 181; LCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 180;

(iii) HCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 168; HCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 167; HCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 166; LCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 185; LCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 184; LCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 183;

(iv) HCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 171; HCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 170; HCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 169; LCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 187; LCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 186; LCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 180;

(v) HCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 174; HCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 173; HCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 172; LCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 189; LCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 188; LCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 180;

(vi) HCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 176; HCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 175; HCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 163; LCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 192; LCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 191; LCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 190; и

(vii) HCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 165; HCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 164; HCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 163; LCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 193; LCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 181; LCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 180.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат комбинацию переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL), выбранных из:

(i) VH, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и VL, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 195 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%;

(ii) VH, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 196 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и VL, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%;

(iii) VH, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 198 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и VL, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 199 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%;

(iv) VH, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 200 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и VL, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 201 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%;

(v) VH, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и VL, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 203 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%;

(vi) VH, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 204 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и VL, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%; и

(vii) VH, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и VL, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 207 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%;

Для вариантов осуществления изобретения, в которых домены антител или их антигенсвязывающих фрагментов определяются конкретным процентом идентичности последовательности с эталонной последовательностью, домены VH и/или VL могут сохранять последовательности CDR, идентичные последовательностям, присутствующим в эталонной последовательности, так, чтобы изменение присутствовало только в каркасных областях.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело представляет собой антитело с VH1, содержащее последовательности CDR, выбранные из группы, состоящей из:

(i) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 210; CDR2, содержащей или состоящей из

SEQ ID NO: 209; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 208;

(ii) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 213; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 212; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 211;

(iii) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 216; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 215; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 214;

(iv) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 219; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 218; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 217;

(v) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 222; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 221; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 220;

(vi) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 225; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 224; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 223;

(vii) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 228; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 227; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 226;

(viii) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 231; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 230; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 229;

(ix) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 234; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 233; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 232;

(x) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 236; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 235; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 226;

(xi) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 238; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 237; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 232;

(xii) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 241; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 240; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 239;

(xiii) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 236; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 235; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 226;

(xiv) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 244; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 243; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 242;

(xv) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 234; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 233; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 232;

(xvi) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 247; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 246; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 245; и

(xvii) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 249; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 248; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 217.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело представляет собой антитело с VHH, в котором домен VHH содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной любой из SEQ ID NO: 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265 или 266, или аминокислотной последовательности, идентичной ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%.

Для вариантов осуществления изобретения, в которых домены VHH определяются конкретным процентом идентичности последовательности с эталонной последовательностью, домен VHH может сохранять последовательности CDR, идентичные последовательностям, присутствующим в эталонной последовательности, так, чтобы изменение присутствовало только в каркасных областях.

Настоящее изобретение также относится к антителу или к его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с таким же эпитопом, как и антитела или антигенсвязывающие фрагменты, определенные здесь со ссылкой на конкретные SEQ ID NO. Настоящее изобретение также относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, включая полинуклеотиды, кодирующие домены VH и/или VL антител и антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем изобретении. Настоящее изобретение также относится к экспрессионному вектору, содержащему вышеупомянутые полинуклеотиды, функционально присоединенные к регуляторным последовательностям, которые обеспечивают экспрессию антитела, антигенсвязывающего фрагмента, переменного домена тяжелой цепи или переменного домена легкой цепи в клетке-хозяине или бесклеточной экспрессионной системе. Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам или к бесклеточным экспрессионным системам, содержащим вышеупомянутые экспрессионные векторы.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей антагонист согласно первому аспекту изобретения, а в частности, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

Кроме того, настоящее изобретение относится к антагонисту согласно первому аспекту изобретения, а в частности, к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, или к фармацевтической композиции согласно изобретению для ее применения в качестве лекарственного средства.

В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения индивидуума, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества антагониста согласно первому аспекту изобретения, а в частности, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или фармацевтической композиции согласно изобретению. Антагонист, анти-

тело, антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция могут быть введены для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание или состояние выбрано из: астмы; хронического риносинусита; глютеновой болезни; гельминтной инфекции; эозинофильного воспаления желудочно-кишечного тракта; кистозного фиброза (КФ); аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА); васкулита Черга-Штрауса; хронической эозинофильной пневмонии; и острого миелоидного лейкоза. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, антагонисты, антитела, антигенсвязывающие фрагменты или фармацевтические композиции вводят для лечения астмы.

Настоящее изобретение также относится к применению антагониста согласно первому аспекту изобретения, а в частности, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, для детектирования галектина-10 в образце, взятом у пациента. Антагонист, антитело или антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно используют для детектирования кристаллического галектина-10. Образец, взятый у пациента, может представлять собой образец мокроты.

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему антагонист галектина-10 согласно первому аспекту изобретения, а предпочтительно, антитело к галектину-10 или его антигенсвязывающий фрагмент, и, необязательно, инструкции по их применению.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1: получение рекомбинантных кристаллов Gal10, напоминающих кристаллы CLC *in vivo*.

His-меченный Gal10 экспрессируется в *E.coli*. (A) - электрофорез в ДСН-ПААГ для His-меченного Gal10 до и после добавления протеазы TEV для удаления His-метки. (B) - мультиугловое лазерное рассеяние (MALLS) выявило молекулярную массу приблизительно 40 кДа, что соответствует димерной форме His-меченного Gal10 в растворе. (C) - после расщепления протеазой TEV, раствор белка спонтанно кристаллизуется в игольчатые кристаллы. (D) - первое изображение Шарко (1853), описывающее различные формы кристаллов, наблюдаемых в дыхательных путях астматиков. (E) - снимки различных форм кристаллов, полученные из флуоресцентно меченой партии рекомбинантных кристаллов Gal10. Были обнаружены все макроскопические формы кристаллов, впервые описанные Шарко и фон Лейде-ном.

Фиг. 2: выделение и кристаллическая структура выращенных *in vivo* кристаллов CLC у пациентов с синуситом.

(A) - образцы слизи были взяты во время операции у пациентов с хроническим риносинуситом и полипами носа (CRSwNP). На этом чертеже показана ткань полипа. (B) - иммуноокрашивание на Gal10 выявило большое количество кристаллического материала в муцине слизистой при аллергии. Подобная слизь также обнаруживалась в дыхательных путях у астматиков и пациентов с АВРА. (C) - полученный *ex vivo* кристалл был предназначен для исследований методами рентгеновской дифракции. (D) - дифракционная рентгенограмма кристалла, полученного от пациента. (E) - кристаллическая структура CLC, взятого у пациента, обнаруживала димерную природу. (F) - сравнение полученной *ex vivo* кристаллической структуры с рекомбинантно полученными кристаллами Gal10 и с опубликованными перекристаллизованными кристаллами CLC, полученными из клеточной линии эозинофилов человека (AML14.3D10), показало полное сходство (отклонение от среднеквадратического расстояния (RMSD) на 0,2 Ангстрем), что указывает на то, что рекомбинантные кристаллы Gal10 биологически сходны с CLC.

Фиг. 3: создание устойчивых к кристаллизации мутеинов Gal10 путем тщательного анализа пограничного слоя упаковки кристаллов Gal10.

(A) и (B) - показанные крупным планом изображения различных аминокислот, непосредственно участвующих в создании пограничного слоя упаковки кристаллов между двумя соседними димерами Gal10. Выделенные аминокислоты были выбраны для анализа на мутацию и создания мутеинов. (C) - эксперимент по спонтанной кристаллизации белка Gal10 дикого типа и мутеина после удаления His-метки протеазой TEV. Мутеин Tyr69Glu был полностью резистентным к аутокристаллизации и был использован в описании в качестве устойчивого к кристаллизации растворимого мутеина Gal10. (D) - рентгеновская структура мутеина Gal10 Tyr69Glu. Эта структура была использована для моделирования профиля рассеяния в эксперименте по малоугловому рассеянию рентгеновских лучей в растворе (SAXS) мутеина Tyr69Glu в растворе. (E) - данные эксперимента SAXS перекрываются с моделированными данными, что, по существу, указывает на то, что мутеин образует димер в растворе. (F) - перекрывание структур дикого типа с мутантом Y69E Gal10, исходя из данных SAXS.

Фиг. 4: врожденное воспаление дыхательных путей, вызываемое кристаллами Gal10.

Мышам C57Bl/6 интратрахеально вводили кристаллы Gal10, растворимый Gal10mut или контрольный PBS. (A) - количество нейтрофилов (левая панель) и моноцитов (правая панель), выделенных из легких через 6 и 24 ч после лечения. (B) - уровни IL-6 (левая панель) и TNF $\alpha$  (правая панель) в бронхоальвеолярном лаваже через 6 ч и через 24 ч после лечения, (C) - уровни IL-1 $\beta$  и CCL-2 в легких через 6 ч и 24 ч после лечения. NS означает величину  $p > 0,12$ ; \* означает величину  $p < 0,033$ ; \*\* означает величину  $p < 0,002$ ; \*\*\* означает величину  $p < 0,0002$ ; \*\*\*\* означает величину  $p < 0,0001$ .

Фиг. 5: врожденное воспаление, вызываемое кристаллами Gal10, не зависит от инфламмосомы

NLRP3.

Nlrp3-дефицитным (левая панель) мышам и мышам с дефицитом каспазы 1/11 (правая панель) (дефицитные мыши обозначаются -/-) и мышам этого же помета дикого типа (обозначаемым +/-) интратрахеально вводили кристаллы Gal10 или PBS-контроль. Количество нейтрофилов, выделенных из гидролизованых легких мышей различных линий, определяли через 6 ч и 24 ч после обработки. NS означает величину  $p > 0,12$ ; означает величину  $p < 0,033$ ; \*\* означает величину  $p < 0,002$ ; \*\*\* означает величину  $p < 0,0002$ ; \*\*\*\* означает величину  $p < 0,0001$ .

Фиг. 6: врожденное воспаление, вызываемое кристаллами Gal10, не зависит от TLR4.

Мышам, дефицитным по ловушко-подобному рецептору 4 (TLR4), и мышам этого же помета дикого типа интратрахеально вводили кристаллы Gal10 или PBS-контроль. Количество нейтрофилов, выделенных из гидролизованых легких мышей различных линий, определяли через 24 ч после обработки. NS означает величину  $p > 0,12$ ; означает величину  $p < 0,033$ ; \*\* означает величину  $p < 0,002$ ; \*\*\* означает величину  $p < 0,0002$ ; \*\*\*\* означает величину  $p < 0,0001$ .

Фиг. 7: кристаллы Gal10 усиливают признаки астмы, наблюдаемые у человека, у гуманизированной модели этого заболевания.

(A) - экспериментальные данные, иллюстрирующие режим введения доз экстрактов клеща домашней пыли (HDM) и различных форм галектина-10. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) вводили внутривентриально. Экстракты клеща домашней пыли (HDM), кристаллы Шарко-Лейдена (CLC) и мутантный галектин-10 (Gal10<sup>mut</sup>) вводили интратрахеально. (B) - количество человеческих CD45<sup>+</sup>-лейкоцитов, выделенных из левого легкого мышей, обработанных, как описано в (A). (C) - уровни человеческого IgE, измеренные в сыворотке мышей, обработанных, как описано в (A).

Фиг. 8: предотвращение аутокристаллизации Gal10 *in vitro* путем добавления антител к Gal10.

(A) Gal10 подвергали аутокристаллизации путем удаления HIS-метки под действием протеазы TEV. Этот анализ осуществляли в присутствии различных Gal10-специфических клонов антител scFv-Fc или нерелевантных антител scFv-Fc, и образование кристаллов наблюдали в роботе-кристаллизаторе. (B) - обзор активности различных антител scFv-Fc и IgG1.

Фиг. 9: временные изображения растворения кристаллов 4 клонами антител IgG1.

(A) - для того чтобы определить, могут ли антитела растворять имеющиеся кристаллы, к выращенным *in vitro* кристаллам Gal10 были добавлены клоны, и было проведено исследование с помощью конфокальной микроскопии с вращающимся диском. Все 4 клон полностью растворяли кристаллы в течение 90 мин, тогда как для антител нерелевантного изотипа этого не наблюдалось. (B) - кривая кинетического растворения кристаллов при добавлении антител, растворяющих кристаллы. Общая площадь преломляющего кристаллического материала при высоком увеличении микроскопа с вращающимся диском была интегрирована и нормирована к 1 перед добавлением кристаллов.

Фиг. 10: кристаллическая структура Fab-фрагментов клонов, растворяющих кристаллы, в комплексе с Gal10.

Кристаллы смеси Fab-фрагментов и рекомбинантного Gal10 были получены с использованием робота-кристаллизатора, а затем проанализированы методом дифракции рентгеновских лучей (A-C). Кристаллическая структура Gal10 изображена в виде мультипликационной модели (показано черным). Легкая цепь (LC) и тяжелая цепь (HC) Fab-фрагментов показана в виде поверхностной модели, где LC показан белый, а HC - темно-серым. (D-F) Все три клон, для которых может быть получена структура совместной кристаллизации, нацелены на представляющий интерес остаток Tyr69 Gal10.

Фиг. 11: соллюбилизация кристаллов CLC в слизи пациентов с CRSwNP под действием антител.

Свежий липкий аллергический муцин пациентов с CRSwNP собирали во время рутинной хирургической операции на носовых пазухах и хранили в течение 2 дней перед добавлением кристалл-растворяющих антител или антител контрольного изотипа. Кристаллы можно было легко идентифицировать в свежей слизи пациентов из-за их высоких дифракционных свойств на конфокальном микроскопе с вращающимся диском. При добавлении кристалл-растворяющих антител, кристаллы растворялись в течение ночи.

Фиг. 12: доказательство концепции о том, что соллюбилизация кристаллов Gal10 *in vivo* снижает ключевые признаки астмы у гуманизированной мыши-модели.

(A) - экспериментальные данные, иллюстрирующие схему введения доз экстрактов клеща домашней пыли (HDM), кристаллов галектина 10 и антител. Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) вводили внутривентриально. Экстракты клеща домашней пыли (HDM), кристаллы галектина 10, антитела 1D11 и контрольные антитела вводили интратрахеально. (B) - окрашивание срезов легких гематоксилином-эозином. (C) - уровни человеческого IgE, измеренные в сыворотке. (D) - экспрессия мРНК муцина Muc5ac в легких мышей, обработанных, как описано в (A). (E) - количественный анализ изображений, сделанный путем исследования слепым методом для определения количества воспалительных клеток, простирающихся в область с периметром 500 мкм от базальной мембраны, и по всей длине базальной мембраны. (F) - бронхосужающее действие, измеренное как динамическая резистентность дыхательных путей (Rrs) после ингаляции возрастающих концентраций бронхосуживающего метаколина.

Фиг. 13: скрининг периплазматических экстрактов scFv с помощью ELISA.

Способность галектина-10 связываться с периплазматическими экстрактами scFv определяли с помощью ELISA на связывание, как описано в настоящем изобретении. Поглощение измеряли на 450 нм (эталон на 620 нм). В каждый планшет с периплазматическим экстрактом Master (PMР) были включены пустой контроль и негативный контроль (периплазматический экстракт, связывающийся с нерелевантной мишенью). Необработанные данные (значения OD) были использованы для построения графика GraphPad Prism 7.01. Связывающее вещество определяли как scFv, обладающий связывающей способностью при значении выше 0,5 OD в ELISA на связывание.

Фиг. 14: скрининг периплазматических экстрактов scFv с применением технологии BLI.

Способность галектина-10 связываться с выбранными периплазматическими экстрактами scFv анализировали с применением технологии BLI с использованием Octet Red96. Был применен метод захвата, при котором галектин-10-His человека и собакоподобных обезьян (изоформы WGS или REF) иммобилизовали на биосенсорах с антителами против His1K перед инкубированием с разбавленными отобранными периплазматическими экстрактами scFv. Скорость диссоциации для каждого клона scFv представлена на графике GraphPad Prism 7.01.

Фиг. 15: растворение кристаллов антителами IgG1 к Gal10.

Для того, чтобы определить, могут ли антитела к Gal10 растворять имеющиеся кристаллы, к выращенным *in vitro* кристаллам человеческого рекомбинантного Gal10 были добавлены клоны, и было проведено исследование с помощью конфокальной микроскопии с вращающимся диском. Все 8 клонов полностью растворили кристаллы в течение исследуемого периода времени, тогда как для антител нерелевантного изотипа этого не наблюдалось.

Фиг. 16: кристаллическая структура Fab-фрагментов кристалл-растворяющих клонов в комплексе с Gal10.

Кристаллы смеси Fab-фрагментов и рекомбинантного Gal10 получали с использованием робота-кристаллизатора, а затем анализировали методом дифракции рентгеновских лучей.

Фиг. 17: растворение кристаллов антителами IgG1 и Fab-фрагментами к Gal10.

Эксперименты по растворению CLC с использованием предварительно полученных рекомбинантных человеческих CLC осуществляли в течение определенного периода времени в присутствии mAb к Gal10 и Fab к Gal10. Растворение кристаллов наблюдали с помощью конфокальной микроскопии с вращающимся диском.

Фиг. 18: скрининг периплазматических экстрактов VHH с помощью ELISA.

Способность галектина-10 связываться с периплазматическими экстрактами VHH определяли с помощью ELISA на связывание, как описано в настоящем изобретении. Поглощение измеряли на 450 нм (эталон на 620 нм). В каждый планшет с периплазматическим экстрактом Master (PMР) были включены пустой контроль и негативный контроль (периплазматический экстракт VHH, связывающийся с нерелевантной мишенью). Необработанные данные (значения OD) были использованы для построения графика GraphPad Prism 7.01.

Фиг. 19: скрининг периплазматических экстрактов VHH с применением технологии BLI.

Способность связываться с выбранными периплазматическими экстрактами VHH анализировали с применением технологии BLI с использованием Octet Red96. Для этой цели был применен метод захвата, при котором галектин-10-His человека и собакоподобных обезьян (изоформы WGS или YRT) иммобилизовали на биосенсорах с антителами против His1K перед инкубированием с разбавленными отобранными периплазматическими экстрактами VHH. Скорость диссоциации (1/c) и ответ (нм) для каждого клона VHH использовали для построения графика GraphPad Prism 7.01.

Фиг. 20: растворение кристаллов антителами VHH к Gal10.

Эксперименты по растворению CLC с использованием предварительно полученных рекомбинантных человеческих CLC осуществляли в течение определенного периода времени в присутствии антител с VHH к Gal10. Растворение кристаллов наблюдали с помощью конфокальной микроскопии с вращающимся диском.

### Подробное описание

#### А. Определения.

Если это не оговорено особо, то все используемые здесь технические и научные термины имеют значения, хорошо известные специалистам в области, к которой относится изобретение.

"Антагонист" - используемый здесь термин "антагонист" означает любой агент, способный связываться с галектином-10 и экранировать пограничный слой упаковки кристаллов. При экранировании или "затемнении" пограничного слоя упаковки кристаллов, функция антагониста заключается в нарушении кристаллизации молекул галектина-10. Антагонисты согласно изобретению обычно связываются или "специфически связываются" с галектином-10. Термин "специфически связываться" относится к способности антагониста преимущественно связываться со своей мишенью, а в данном случае, с галектином-10. Агенты, способные связываться с белками-мишенями, а в частности, агенты, способные специфически связываться с данным белком-мишенью, известные специалистам в данной области. Такие агенты включают, но не ограничиваются ими, низкомолекулярные ингибиторы, биологические молекулы, включая ингибирующие пептиды, и антитела-миметики, такие как аффиантитела, аффилины, аффитины, аднекти-

ны, атимеры, эвазины, DAR-ины, антикаины, авимеры, фиомеры, версаантитела и дуокаины. Предпочтительными антагонистами согласно изобретению являются антитела и их антигенсвязывающие фрагменты.

"Антитело" или "иммуноглобулин". Используемый здесь термин "иммуноглобулин" включает полипептид, имеющий комбинацию двух тяжелых и двух легких цепей, независимо от того, обладает ли он какой-либо соответствующей специфической иммунореактивностью или нет. Термин "антитела" означает такие комплексные молекулы, которые обладают достаточно известной специфической иммунореактивностью по отношению к представляющему интерес антигену (в данном случае, к галектину-10). Термин "антитела к галектину-10" используется здесь для обозначения антител, которые обладают иммунологической специфичностью в отношении белка галектина-10, включая человеческий галектин-10, а в некоторых случаях, его видовые гомологи. Антитела и иммуноглобулины содержат легкие и тяжелые цепи с ковалентной межцепочечной связью между ними или без нее. Основные структуры иммуноглобулинов в системах позвоночных относительно хорошо изучены.

Общий термин "иммуноглобулин" включает пять различных классов антител, которые биохимически отличаются друг от друга. Все пять классов антител входят в объем настоящего изобретения. Ниже следующее обсуждение, в основном, будет направлено на молекулы иммуноглобулинов класса IgG. Что касается IgG, то иммуноглобулины содержат две идентичные легкие полипептидные цепи с молекулярной массой приблизительно 23000 Дальтон и две идентичные тяжелые цепи с молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи соединены дисульфидными связями в конфигурации "Y", где легкие цепи соединяют тяжелые цепи, начиная с "устья" "Y" и простираясь через всю переменную область.

Легкие цепи антитела классифицируются как каппа или лямбда ( $\kappa$ ,  $\lambda$ ). Тяжелая цепь каждого класса может быть связана с легкой цепью каппа или лямбда. Вообще говоря, легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, а "хвостовые" части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, если иммуноглобулины продуцируются гибридомами, В-клетками или генетически сконструированными клетками-хозяевами. В тяжелой цепи, аминокислотные последовательности простираются от N-конца на разветвленных концах Y-конфигурации до C-конца в нижней части каждой цепи. Специалистам в данной области известно, что тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон ( $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ), некоторые из которых подразделяются на подклассы (например,  $\gamma 1$ - $\gamma 4$ ). Природа этой цепи определяет "класс" антител, а именно, IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.п., хорошо охарактеризованы и, как известно, сообщают функциональную специализацию. Модифицированные варианты каждого из этих классов и изотипов могут быть легко отличимы квалифицированным специалистом исходя из описания настоящего изобретения и, соответственно, входят в объем настоящего изобретения.

Как указывалось выше, переменная область антитела позволяет антителу селективно распознавать эпитопы на антигенах и специфически связываться с ними. То есть, домен VL и домен VH антитела объединяются с образованием переменной области, которая определяет трехмерный сайт связывания с антигеном. Эта четвертичная структура антитела образует сайт связывания с антигеном, присутствующий на конце каждой ветви Y. Более конкретно, сайт связывания с антигеном определяется тремя комплементарность-определяющими областями (CDR) на каждой из цепей VH и VL.

Используемый здесь термин "антитело" также охватывает "VHH-антитела" или "антитела, содержащие только тяжелые цепи".

"VHH-антитела" - используемый здесь термин "VHH-антитело" или "антитело только с тяжелой цепью" относится к типу антител, продуцируемых только видами семейства верблюдовых (Camelidae), которое включает верблюдов, лам, альпак. Антитела, содержащие только тяжелые цепи, или антитела с VHH состоят из двух тяжелых цепей и не содержат легких цепей. Каждая тяжелая цепь имеет переменный домен у N-конца, и эти переменные домены называются доменами "VHH", чтобы отличать их от переменных доменов тяжелых цепей обычных гетеротетрамерных антител, то есть доменов VH, описанных выше.

"Галектин-10" - используемый здесь термин "галектин-10" (или Gal10, или Gal-10) означает небольшой гидрофобный гликан-связывающий белок, который аутокристаллизуется с образованием кристаллов Шарко-Лейдена. Галектин-10 также называется кристаллическим белком Шарко-Лейдена (CLCP), лизофосфолипазой эозинофилов и лизолецитин-ацилгидролазой. Термин "галектин-10" является достаточно широким и охватывает человеческий белок и любые видовые гомологи. Аминокислотная последовательность полноразмерного человеческого галектина-10 представлена SEQ ID NO: 141 (см. ниже). Эта последовательность соответствует последовательности, депонированной в базе данных UniProt как человеческий галектин-10, под номером доступа Q05315. Термин "галектин-10" также охватывает встречающиеся в природе варианты человеческой последовательности, например вариант Ala → Val в положении 28.

SEQ ID NO: 141

1	10	20	30	40	50
MSLLFPVYTE	AASLSTGSTV	TIKGRPLACF	LNEPYLQVDF	HTEMKEESDI	
	60	70	80	90	100
VFHFQVCFGR	RVVMNSREYG	AWKQQVESKN	MFPQDQQEFE	LSISVLPDKY	
	110	120	130	140	
QVMVNGQSSY	TFDHRIKPEA	VKMVQVWRDI	SLTKFNVSYL	KR	

"Кристаллы галектина-10" или "кристаллы Шарко-Лейдена" - термины "кристаллы галектина-10", "кристаллы Шарко-Лейдена" и "CLC" используются здесь как синонимы и означают кристаллы, образованные галектином-10. Кристаллы, образованные галектином-10, обычно представляют собой бипирамидальные гексагональные кристаллы и имеют длину приблизительно 20-40 мкм и ширину приблизительно 2-4 мкм. Эти кристаллы ассоциируются с эозинофильными воспалительными заболеваниями.

"Пограничный слой упаковки кристаллов" - "пограничный слой упаковки кристаллов" галектина-10 означает набор аминокислот, образующих поверхностный участок на галектине-10, который контактирует с одной или более соседними молекулами галектина-10 в кристаллической решетке. CLC имеют различные пограничные слои упаковки кристаллов, а аминокислоты, образующие эти пограничные слои упаковки кристаллов, были охарактеризованы как: Ser2, Leu3, Leu4, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Ala12, Ser13, Thr16, Thr42, Glu43, Met44, Lys45, Asp49, Ile50, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Leu96, Pro97, Asp98, Lys99, Gln101, Met103, Gly106, Gln107, Ser108, Ser109, Tyr110, Thr111, Asp113, His114, Arg115, Ile116, Lys117, Ala120, Gln125, Thr133, Lys134, Phe135, Asn136, Val137, Ser138, Tyr139, Leu140 и Lys141, где положения определены выше со ссылкой на SEQ ID NO: 141.

"Эпитоп" - используемый здесь термин "эпитоп" означает область белка галектина-10, с которой связывается антагонист. Антагонист обычно связывается со своим соответствующим эпитопом галектина-10 посредством комплементарного сайта связывания на антагонисте. Эпитоп, с которым связывается антагонист, обычно будет включать одну или более аминокислот полноразмерного белка галектина-10. Эпитоп может включать аминокислоты, которые являются смежными в белке галектина-10, то есть, линейный эпитоп, или может включать аминокислоты, которые не являются смежными в белке галектина-10, то есть, конформационный эпитоп.

"Сайт связывания" - используемый здесь термин "сайт связывания" включает область полипептида, которая ответственна за селективное связывание с представляющим интерес антигеном-мишенью (например, галектином-10). Связывающие домены содержат по меньшей мере один сайт связывания. Типичные связывающие домены включают варибельный домен антитела. Молекулы антител согласно изобретению могут содержать один сайт связывания или множество (например, два, три или четыре) сайтов связывания.

"Происходит от" - используемый здесь термин "происходит от" указанного белка (например, верблюжьего антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) относится к происхождению полипептида или аминокислотной последовательности. В одном варианте осуществления изобретения, полипептид или аминокислотная последовательность, которые происходят от конкретного исходного полипептида, представляют собой последовательность CDR или родственную ей последовательность. В одном варианте осуществления изобретения, аминокислотная последовательность, происходящая от конкретного исходного полипептида, не является непрерывной. Так, например, в одном варианте осуществления изобретения, одна, две, три, четыре, пять или шесть CDR происходят от исходного антитела. В одном варианте осуществления изобретения, полипептид или аминокислотная последовательность, которые происходят от конкретного исходного полипептида или аминокислотной последовательности, имеют аминокислотную последовательность, которая, по существу, идентична этой исходной последовательности, или ее части, где указанная часть состоит по меньшей мере из 3-5 аминокислот, по меньшей мере из 5-10 аминокислот, по меньшей мере из 10-20 аминокислот, по меньшей мере из 20-30 аминокислот или по меньшей мере из 30-50 аминокислот, или которая так или иначе может быть идентифицирована специалистом в данной области как происходящая от исходной последовательности. В одном варианте осуществления изобретения, одну или более последовательностей CDR, происходящих от исходного антитела, модифицируют для получения вариантов последовательностей CDR, например, аффинных вариантов, где варианты последовательностей CDR сохраняют свою активность связывания с антигеном-мишенью.

"Верблюжье производное" - в некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения, антитела согласно изобретению содержат аминокислотные последовательности каркасной области и/или аминокислотные последовательности CDR, происходящие от стандартного верблюжьего антитела или антитела с VHH, полученного в результате активной иммунизации верблюдовых. Однако, антитела согласно изобретению, содержащие аминокислотные последовательности, происходящие от верблюдовых, могут быть сконструированы так, чтобы они содержали последовательности каркасной и/или константной области, происходящие от аминокислотной последовательности человека (то есть, человеческого антитела) или других видов млекопитающих, не являющихся верблюдовыми. Так, например, в антитела

к галектину-10 могут быть включены каркасная область, часть тяжелой цепи и/или шарнирная область человека или примата, не являющегося человеком. В одном варианте осуществления изобретения, одна или более аминокислот, не происходящих от верблюдовых, могут присутствовать в каркасной области антитела, "происходящего от верблюдовых", например, аминокислотная последовательность каркасной области верблюдовых может содержать одну или более аминокислотных мутаций, в которых присутствует соответствующий аминокислотный остаток человека или примата, не являющегося человеком. Кроме того, домены VH и VL, происходящие от верблюдовых, или их гуманизованные варианты, могут быть связаны с константными доменами человеческих антител с образованием химерной молекулы, как описано в настоящем изобретении.

"Консервативная аминокислотная замена" - "консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены специалистами в данной области, включая аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), с кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), с незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), с неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), с бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и с ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, заменимый аминокислотный остаток в полипептиде иммуноглобулина может быть заменен другим аминокислотным остатком с боковой цепью того же семейства. В других вариантах осуществления изобретения, последовательность аминокислот может быть заменена структурно аналогичной цепью, которая отличается порядком и/или составом членов семейства боковых цепей.

"Часть тяжелой цепи" - используемый здесь термин "часть тяжелой цепи" включает аминокислотные последовательности, происходящие от константных доменов тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий часть тяжелой цепи, включает по меньшей мере один из: доменов СН1, доменов шарнирной области (например, верхней, средней и/или нижней шарнирной области), доменов СН2, доменов СН3 или их вариантов или фрагментов. В одном варианте осуществления изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению может включать Fc-часть тяжелой цепи иммуноглобулина (например, шарнирную часть, домен СН2 и домен СН3). В другом варианте осуществления изобретения, антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению может не содержать по меньшей мере часть константного домена (например, весь домен СН2 или его часть). В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере один, а предпочтительно, все константные домены происходят от тяжелой цепи иммуноглобулина человека. Так, например, в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения, часть тяжелой цепи включает полностью человеческий шарнирный домен. В других предпочтительных вариантах осуществления изобретения, часть тяжелой цепи включает полностью человеческий Fc-фрагмент (например, шарнирные последовательности, последовательности доменов СН2 и СН3 от человеческого иммуноглобулина).

В некоторых вариантах осуществления изобретения, константные домены, составляющие часть тяжелой цепи, происходят из различных молекул иммуноглобулинов. Так, например, часть тяжелой цепи полипептида может содержать домен СН2, происходящий от молекулы IgG1, и шарнирную область, происходящую от молекулы IgG3 или IgG4. В других вариантах осуществления изобретения, константные домены представляют собой химерные домены, содержащие части различных молекул иммуноглобулинов. Так, например, шарнирная область может содержать первую часть молекулы IgG1 и вторую часть молекулы IgG3 или IgG4. Как изложено выше, специалисту в данной области будет очевидно, что константные домены части тяжелой цепи могут быть модифицированы так, чтобы их аминокислотная последовательность отличалась от аминокислотной последовательности природной молекулы иммуноглобулина (дикого типа). То есть, полипептиды согласно изобретению, описанные в настоящем изобретении, могут содержать изменения или модификации одного или нескольких константных доменов тяжелой цепи (СН1, шарнирной области, СН2 или СН3) и/или домена константной области легкой цепи (СL). Примеры модификаций включают добавления, делеции или замены одной или более аминокислот в одном или более доменах.

"Химерный" - "химерный" белок содержит первую аминокислотную последовательность, связанную со второй аминокислотной последовательностью, с которой он не связан в природе. Аминокислотные последовательности обычно могут присутствовать в отдельных белках, которые объединены вместе в гибридный полипептид, либо они могут присутствовать в одном и том же белке, но располагаться в другом новом порядке. Химерный белок может быть получен, например, путем химического синтеза или путем создания и трансляции полинуклеотида, в котором пептидные области кодируются в желаемом соотношении. Типичные химерные антитела согласно изобретению включают гибридные белки, содержащие домены VH и VL верблюдовых или их гуманизованные варианты, связанные с константными доменами человеческого антитела, например человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

"Вариабельная область" или "вариабельный домен" - используемые здесь термины "вариабельная

область" и "вариабельный домен" являются синонимами и имеют эквивалентные значения. Термин "вариабельный" означает, что определенные части вариабельных доменов VH и VL в значительной степени различаются по последовательностям антител и используются для связывания и сообщения специфичности каждого конкретного антитела по отношению к его антигену-мишени. Однако, вариабельность неравномерно распределена по вариабельным доменам антител. Она сконцентрирована в трех сегментах, называемых "гипервариабельными петлями", в каждом из доменов VL и VH, которые образуют часть сайта связывания с антигеном. Первая, вторая и третья гипервариабельные петли домена легкой цепи V-лямбда обозначаются здесь как L1( $\lambda$ ), L2( $\lambda$ ) и L3( $\lambda$ ) и могут быть определены как содержащие остатки 24-33 (L1( $\lambda$ ), состоящие из 9, 10 или 11 аминокислотных остатков), 49-53 (L2( $\lambda$ ), состоящие из 3 остатков) и 90-96 (L3( $\lambda$ ), состоящие из 5 остатков) в домене VL (Morea et al., *Methods* 20: 267-279 (2000)). Первая, вторая и третья гипервариабельные петли домена легкой цепи V-каппа обозначаются здесь как L1( $\kappa$ ), L2( $\kappa$ ) и L3( $\kappa$ ) и могут быть определены как содержащие остатки 25-33 (L1( $\kappa$ ), состоящие из 6, 7, 8, 11, 12 или 13 остатков), 49-53 (L2( $\kappa$ ), состоящие из 3 остатков) и 90-97 (L3( $\kappa$ ), состоящие из 6 остатков) в домене VL (Morea et al., *Methods* 20: 267-279 (2000)). Первая, вторая и третья гипервариабельные петли домена VH обозначаются здесь как H1, H2 и H3 и могут быть определены как содержащие остатки 25-33 (H1, состоящие из 7, 8 или 9 остатков), 52-56 (H2, состоящие из 3 или 4 остатков) и 91-105 (H3, в высокой степени вариабельные по длине) в домене VH (Morea et al., *Methods* 20: 267-279 (2000)).

Если это не оговорено особо, то термины L1, L2 и L3 соответственно относятся к первой, второй и третьей гипервариабельным петлям домена VL и охватывают гипервариабельные петли, происходящие от изоформ V-каппа и V-лямбда. Термины H1, H2 и H3 соответственно относятся к первой, второй и третьей гипервариабельным петлям домена VH и охватывают гипервариабельные петли, происходящие от любого из известных изоформ тяжелой цепи, включая  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$  или  $\mu$ .

Каждая гипервариабельная петля L1, L2, L3, H1, H2 и H3 может включать часть "комплементарность-определяющей области" или "CDR", как определено ниже. Термины "гипервариабельная петля" и "комплементарность-определяющая области" не являются строгими синонимами, поскольку гипервариабельные петли (HV) определяются по структуре, тогда как "комплементарность-определяющие области" (CDR) определяются по вариабельности последовательностей (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1983)), а пределы HV и CDR могут быть различными в некоторых доменах VH и VL.

CDR доменов VL и VH можно определить как содержащие нижеследующие аминокислоты: остатки 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в вариабельном домене легкой цепи и остатки 31-35 или 31-35b (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в вариабельном домене тяжелой цепи (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Таким образом, HV могут содержаться в соответствующих CDR, и ссылки в данном описании на "гипервариабельные петли" доменов VH и VL следует интерпретировать как включающие также соответствующие CDR, и наоборот, если это не оговорено особо.

Более высококонсервативные части вариабельных доменов называются каркасной областью (FR), как определено ниже. Каждый из вариабельных доменов нативных тяжелых и легких цепей содержит четыре FR (FR1, FR2, FR3 и FR4, соответственно), которые в значительной степени принимают  $\beta$ -складчатую конфигурацию и соединены тремя гипервариабельными петлями. Гипервариабельные петли в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости посредством FR и вместе с гипервариабельными петлями из другой цепи вносят свой вклад в образование антигенсвязывающего сайта антител. Структурный анализ антител выявил взаимосвязь между последовательностью и формой сайта связывания, образованного комплементарность-определяющими областями (Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 227: 799-817 (1992)); Tramontano et al., *J. Mol. Biol.* 215: 175-182 (1990)). Несмотря на высокую вариабельность последовательностей, пять из шести петель имеют лишь небольшой набор конформаций основной цепи, называемых "каноническими структурами". Эти конформаций определяются, во-первых, длиной петель и, во-вторых, наличием ключевых остатков в определенных положениях в петлях и в каркасных областях, которые определяют конформацию благодаря их упаковке, водородным связям или способности принимать необычные конформаций главной цепи.

"CDR" - используемый здесь термин "CDR" или "комплементарность-определяющая область" означает несмежные антигенсвязывающие сайты, обнаруженные в вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Эти конкретные области были описаны Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977) и Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (1991) и Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987) и MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996), где определения включают перекрывание или подмножество аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, как определено в каждой из приведенных выше ссылок, приведены лишь для сравнения. Предпочтительно, термин "CDR" означает CDR, как определено Кабатом исходя из сравнений последовательностей.

## Определения CDR

	Определение CDR		
	Кэбат <sup>1</sup>	Чотия <sup>2</sup>	МакКаллум <sup>3</sup>
V <sub>H</sub> CDR1	31-35	26-32	30-35
V <sub>H</sub> CDR2	50-65	53-55	47-58
V <sub>H</sub> CDR3	95-102	96-101	93-101
V <sub>L</sub> CDR1	24-34	26-32	30-36
V <sub>L</sub> CDR2	50-56	50-52	46-55
V <sub>L</sub> CDR3	89-97	91-96	89-96

<sup>1</sup> Нумерация остатков соответствует номенклатуре по Kabat et al., см. выше.

<sup>2</sup> Нумерация остатков соответствует номенклатуре по Chothia et al., см. выше.

<sup>3</sup> Нумерация остатков соответствует номенклатуре по MacCallum et al., см. выше.

"Каркасная область" - используемые здесь термины "каркасная область" или "FR-область" включают аминокислотные остатки, которые являются частью вариабельной области, но не являются частью CDR (например, в соответствии с определением CDR по Кэбату). Следовательно, каркасная вариабельная область имеет длину приблизительно 100-120 аминокислот, но включает только те аминокислоты, которые не входят в CDR. В конкретном примере вариабельного домена тяжелой цепи и CDR, как определено Kabat et al., каркасная область 1 соответствует домену вариабельной области, включающему аминокислоты 1-30; каркасная область 2 соответствует домену вариабельной области, охватывающему аминокислоты 36-49; каркасная область 3 соответствует домену вариабельной области, включающему аминокислоты 66-94, а каркасная область 4 соответствует домену вариабельной области от аминокислоты 103 до конца вариабельной области. Аналогичным образом, каркасные области для легкой цепи разделяются каждой из CDR вариабельной области легкой цепи. Аналогичным образом, в соответствии с определениями CDR по Chothia et al. или McCallum et al., границы каркасной области разделены соответствующими концами CDR, как описано выше. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, CDR определены по Кэбату.

В природных антителах, шесть CDR, присутствующих в каждом мономерном антителе, представляют собой короткие несмежные последовательности аминокислот, которые специфически расположены так, что они образуют сайт связывания с антигеном, поскольку антитело принимает свою трехмерную конфигурацию в водной среде. Остальные вариабельные домены тяжелой и легкой цепи обнаруживают меньшую межмолекулярную изменчивость в аминокислотной последовательности и называются каркасными областями. Каркасные области в значительной степени принимают  $\beta$ -складчатую конформацию, а CDR образуют петли, которые соединяют и, в некоторых случаях, образуют часть  $\beta$ -складчатой структуры. Таким образом, эти каркасные области действуют посредством образования остова, который обеспечивает правильную ориентацию шести CDR за счет межцепочечных нековалентных взаимодействий. Сайт связывания антигена, образованный соответствующим образом расположенными CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу на иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с иммунореактивным антигенным эпитопом. Положение CDR может быть легко определено специалистом в данной области.

"Шарнирная область" - Используемый здесь термин "шарнирная область" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет домен CH1 с доменом CH2. Эта шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям двигаться независимо. Шарнирные области можно подразделить на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux KH et al. J. Immunol. 161: 4083-90 1998). Антитела согласно изобретению, содержащие "полностью человеческую" шарнирную область, могут содержать одну из последовательностей шарнирной области, показанных ниже в табл. 2.

Таблица 2

## Последовательности человеческой шарнирной области

IgG	Верхняя шарнирная область	Средняя шарнирная область	Нижняя шарнирная область
IgG1	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:142)	CPPCP (SEQ ID NO:143)	APELLGGP (SEQ ID NO: 144)
IgG3	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 145)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 146)	APELLGGP (SEQ ID NO: 147)
IgG4	ESKYGPP (SEQ ID NO: 148)	CPSCP (SEQ ID NO: 149)	APEFLGGP (SEQ ID NO: 150)
IgG42	ERK (SEQ ID NO: 151)	CCVECPPPCP (SEQ ID NO: 152)	APPVAGP (SEQ ID NO: 153)

"Домен CH2" - используемый здесь термин "домен CH2" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая простирается, например, приблизительно от остатка 244 до остатка 360 антитела в соответствии со стандартными схемами нумерации (остатки 244-360, по системе нумерации Кэбата и остатки 231-340 по системе нумерации EU, Kabat EA et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest. Bethesda, US Department of Health and Human Services, NIH. 1991). Домен CH2 уникален тем, что он тесно не спаривается с другим доменом. Обычно, две N-связанные разветвленные углеводные цепи расположены между двумя доменами CH2 интактной нативной молекулы IgG. Также хорошо задокументировано, что домен CH3 простирается от домена CH2 до C-конца молекулы IgG и включает приблизительно 108 остатков.

"Фрагмент" - термин "фрагмент", если он относится к антителам согласно изобретению, означает часть или фрагмент антитела или цепи антитела, содержащей меньше аминокислотных остатков, чем интактное или полноразмерное антитело или цепь антитела. Термин "антигенсвязывающий фрагмент" означает полипептидный фрагмент иммуноглобулина или антитела, который связывается с антигеном или конкурирует с интактным антителом (то есть с интактным антителом, от которого он происходит) за связывание с антигеном (то есть, специфически связывается с галектином-10). Используемый здесь термин "фрагмент" молекулы антитела включает антигенсвязывающие фрагменты антител, например, варибельный домен легкой цепи антитела (VL), варибельный домен тяжелой цепи антитела (VH), одноцепочечное антитело (scFv), F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fab-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, одноцепочечное (одновалентное) антитело, диантитела, триантитела, тетраантитела или любую антигенсвязывающую молекулу, образованную комбинацией, сборкой или конъюгированием таких антигенсвязывающих фрагментов. Используемый здесь термин "антигенсвязывающий фрагмент" также охватывает фрагменты антител, выбранные из группы, состоящей из антител с однородной структурой, доменных антител и наноантител. Фрагменты могут быть получены, например, путем химической или ферментативной обработки интактного или полноразмерного антитела или цепи антитела или рекомбинантными способами.

"Fab" - "Fab" или "фрагмент Fab" означают молекулу, состоящую из тяжелой цепи и легкой цепи, где легкая цепь состоит из домена VL и одного константного домена (CL, Скили CL), а тяжелой цепь состоит только из домена VH и домена CH1. Fab-фрагмент обычно представляет собой одну ветвь Y-образной молекулы иммуноглобулина. Fab-фрагмент может быть получен из молекулы иммуноглобулина под действием фермента папаина. Папаин расщепляет молекулы иммуноглобулина в шарнирной области с образованием двух фрагментов Fab и отдельной Fc-области.

"ScFv" или "scFv-фрагмент" - scFv или scFv-фрагмент означает одноцепочечный варибельный фрагмент. ScFv представляет собой гибридный белок домена VH и домена VL антитела, соединенных линкером.

"Валентность" - используемый здесь термин "валентность" означает число потенциальных сайтов связывания с мишенью в полипептиде. Каждый сайт связывания с мишенью специфически связывается с одной молекулой-мишенью или со специфическим сайтом на молекуле-мишени. Если полипептид содержит более одного сайта связывания с мишенью, то каждый сайт связывания с мишенью может специфически связываться с одной и той же молекулой или с различными молекулами (например, он может связываться с различными лигандами или различными антигенами, или с различными эпитопами на одном и том же антигене).

"Специфичность" - термин "специфичность" означает способность связываться (например, подвергаться иммунологической реакции) с данной мишенью, например с галектином-10. Полипептид может быть моноспецифическим и содержать один или более сайтов связывания, которые специфически связываются с мишенью, или полипептид может быть мультиспецифичным и содержать два или более сайтов связывания, которые специфически связываются с одной и той же мишенью или с различными мишенями.

ми.

"Синтетический" - используемый здесь термин "синтетический" относится к полипептидам, которые содержат аминокислотную последовательность, не встречающуюся в природе. Так, например, неприродными полипептидами являются полипептиды, которые представляют собой модифицированные формы природных полипептидов (например, содержащих мутацию, такую как добавление, замена или делеция), или которые содержат первую аминокислотную последовательность (которая может встречаться или не встречаться в природе), которая связывает линейную аминокислотную последовательность со второй аминокислотной последовательностью (которая может встречаться или не встречаться в природе), с которой она не связана в природе.

"Сконструированный" - используемый здесь термин "сконструированный" относится к модификации молекул нуклеиновой кислоты или полипептида методами синтеза (например, рекомбинантными методами, методами синтеза пептидов *in vitro*, путем ферментативного или химического связывания пептидов или посредством некоторых комбинаций этих методов). При этом предпочтительно, чтобы были сконструированы антитела согласно изобретению, включая, например, гуманизованные и/или химерные антитела, и антитела, которые были сконструированы для улучшения одного или более свойств, таких как связывание с антигеном, стабильность/время полужизни или эффекторная функция.

"Модифицированное антитело" - используемый здесь термин "модифицированное антитело" включает синтетические формы антител, которые изменены так, чтобы получить антитела, не встречающиеся в природе, например, антитела, которые содержат по меньшей мере две части тяжелой цепи, но не две полноразмерные тяжелые цепи (такие как антитела с делетированными доменами или миниантитела); мультиспецифические формы антител (например, биспецифические, триспецифические и т.п.), измененные так, чтобы они связывались с двумя или более различными антигенами или с различными эпитопами на одном антигене); молекулы тяжелой цепи, присоединенные к молекулам scFv, и т.п. Молекулы scFv известны специалистам и описаны, например, в патенте США 5892019. Кроме того, термин "модифицированное антитело" включает поливалентные формы антител (например, трехвалентные, четырехвалентные и т.п. антитела, которые связываются с тремя или более копиями одного и того же антигена). В другом варианте осуществления изобретения, модифицированное антитело согласно изобретению представляет собой гибридный белок, содержащий по меньшей мере одну часть тяжелой цепи, в которой отсутствует домен CH<sub>2</sub>, и содержащий связывающий домен полипептида, включающий связывающую часть одного члена пары рецептор-лиганд.

Используемый здесь термин "модифицированное антитело" может также означать варианты аминокислотной последовательности антител согласно изобретению, структура которых определена в настоящем изобретении. Специалисту в данной области будет очевидно, что антитело может быть модифицировано для получения варианта антитела, аминокислотная последовательность которого отличается от аминокислотной последовательности антитела, от которого она происходит. Так, например, могут быть сделаны нуклеотидные или аминокислотные замены, приводящие к консервативным заменам или изменениям в "заменимых" аминокислотных остатках (например, в остатках CDR и/или в каркасных остатках). Аминокислотные замены могут включать замену одной или более аминокислот природной или неприродной аминокислотой.

"Гуманизирующие замены" - используемый здесь термин "гуманизирующие замены" означает аминокислотные замены, при которых аминокислотный остаток, присутствующий в конкретном положении в домене VH или VL антитела (например, верблюжьего антитела к галектину-10), заменяют аминокислотным остатком, который находится в эквивалентном положении в эталонном домене VH или VL человека. Эталонный домен VH или VL человека может представлять собой домен VH или VL, кодируемый человеческой зародышевой линией. Гуманизирующие замены могут быть сделаны в каркасных областях и/или в CDR антител, определенных в настоящем изобретении.

"Гуманизованные варианты" - используемый здесь термин "гуманизованный вариант" означает вариант антитела, который содержит одну или более "гуманизирующих замен" по сравнению с эталонным антителом, где часть эталонного антитела (например, домен VH и/или домен VL или его части, содержащие по меньшей мере одну CDR) имеет аминокислоту, происходящую от нечеловеческих видов, и эти "гуманизирующие замены" присутствуют в аминокислотной последовательности, происходящей от нечеловеческого вида.

"Варианты зародышевых линий" - используемый здесь термин "вариант зародышевых линий" означает, в частности, "гуманизованные варианты", в которых гуманизирующие замены приводят к замене одного или более аминокислотных остатков, присутствующих в конкретном(ых) положении(ях) в домене VH или VL антитела (например, верблюжьего антитела к галектину-10), аминокислотным остатком, который находится в эквивалентном положении в эталонном домене VH или VL человека, кодируемом человеческой зародышевой линией. Обычно, что касается любого данного "зародышевого варианта", те аминокислотные остатки, замененные в зародышевом варианте, взяты исключительно или преимущественно из одного VH- или VL-домена, кодируемого человеческой зародышевой линией. Термины "гуманизованный вариант" и "зародышевый вариант" часто используются здесь как синонимы. Введение одной или более "гуманизирующих замен" в домен VH или VL, происходящий от верблюдовых (например,

лам), приводит к получению "гуманизованного варианта" домена VH или VL, происходящего от верблюдовых (лам). Если замененные аминокислотные остатки происходят преимущественно или исключительно от одной последовательности домена VH или VL, кодируемой зародышевой линией человека, то результатом такой замены может быть "человеческий зародышевый вариант" домена VH или VL, происходящего от верблюдовых (лам).

"Аффинные варианты" - используемый здесь термин "аффинный вариант" означает вариант антитела, который имеет одно или более замен в аминокислотной последовательности по сравнению с эталонным антителом, где аффинный вариант обладает измененной аффинностью к антигену-мишени по сравнению с эталонным антителом. Так, например, аффинные варианты будут демонстрировать измененную аффинность к галектину-10 по сравнению с эталонным антителом к галектину-10. Предпочтительно, аффинный вариант будет обладать повышенной аффинностью к антигену-мишени, например, к галектину-10, по сравнению с эталонным антителом. Аффинные варианты обычно демонстрируют одно или более изменений в аминокислотной последовательности в CDR по сравнению с эталонным антителом. Такие замены могут приводить к замене исходной аминокислоты, присутствующей в данном положении в CDR, другим аминокислотным остатком, который может представлять собой природный аминокислотный остаток или не-природный аминокислотный остаток. Аминокислотные замены могут быть консервативными или неконсервативными.

"Высокая гомология с человеческим антителом" - антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), может рассматриваться как антитело, имеющее высокую гомологию с человеческим антителом, если домены VH и VL, взятые вместе, имеют аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности с наиболее близкими последовательностями VH и VL зародышевой линии человека. Антитела, имеющие высокую гомологию с человеческим антителом, могут включать антитела, содержащие домены VH и VL нативных нечеловеческих антител, которые имеют достаточно высокий % идентичности последовательности с последовательностями зародышевой линии человека, включая, например, антитела, содержащие домены VH и VL обычных верблюжьих антител, а также сконструированные, а в частности, гуманизованные или зародышевые варианты таких антител, а также "полностью человеческие" антитела.

В одном варианте осуществления изобретения, домен VH антитела с высокой гомологией с человеческим антителом может иметь аминокислотную последовательность, которая на 80% или более идентична или гомологична аминокислотной последовательности одного или более человеческих VH-доменов в каркасных областях FR1, FR2, FR3 и FR4. В других вариантах осуществления изобретения, идентичность или гомология аминокислотных последовательностей между доменом VH полипептида согласно изобретению и наиболее близко совпадающей последовательностью домена VH зародышевой линии человека может составлять 85% или более, 90% или более, 95% или более, 97% или более, или до 99%, или даже 100%.

В одном варианте осуществления изобретения, домен VH антитела с высокой гомологией с человеческим антителом может содержать одну или более (например, от 1 до 10) ошибочно совпадающих аминокислотных последовательностей в каркасных областях FR1, FR2, FR3 и FR4 по сравнению с наиболее близко совпадающей последовательностью VH человека.

В другом варианте осуществления изобретения, домен VL антитела с высокой гомологией с человеческим антителом может иметь аминокислотную последовательность, которая на 80% или более идентична или гомологична аминокислотной последовательности одного или более VL-доменов человека в каркасных областях FR1, FR2, FR3 и FR4. В других вариантах осуществления изобретения, идентичность или гомология аминокислотных последовательностей между доменом VL полипептида согласно изобретению и наиболее близко совпадающей последовательностью домена VL зародышевой линии человека может составлять 85% или более, 90% или более, 95% или более, 97% или более, или до 99%, или даже 100%.

В одном варианте осуществления изобретения, домен VL антитела с высокой гомологией с человеческим антителом может содержать одну или более (например, от 1 до 10) ошибочно совпадающих аминокислотных последовательностей в каркасных областях FR1, FR2, FR3 и FR4 по сравнению с наиболее близко совпадающей человеческой последовательностью VL.

В. Антагонисты галектина-10.

В своем первом аспекте, настоящее изобретение относится к антагонисту, который связывается с галектином-10, где антагонист связывается с эпитопом галектина-10 и тем самым экранирует пограничный слой упаковки кристаллов галектина-10. Настоящее изобретение также относится к антагонисту, который связывается с галектином-10, и который, при его связывании с растворимым галектином-10, ингибирует кристаллизацию галектина-10. Настоящее изобретение также относится к антагонисту, который связывается с галектином-10, и который при его связывании с кристаллическим галектином-10, способствует растворению кристаллического галектина-10. Антагонисты согласно изобретению предпочтительно связываются с человеческим галектином-10.

Белок галектин-10 представляет собой относительно небольшой (16,5 кДа) гликан-связывающий белок. Белки галектина-10 образуют димеры в растворе, а также могут образовывать нерастворимые гек-

сагональные бипирамидальные кристаллы. Эти кристаллы впервые были обнаружены у пациентов с аллергической астмой и паразитарными инфекциями, и они также известны как кристаллы Шарко-Лейдена (или CLC).

Антагонисты согласно изобретению связываются с эпитопом галектина-10. Эпитоп может представлять собой линейный эпитоп, то есть, он может состоять из двух или более последовательно расположенных аминокислот в последовательности первичного белка галектина-10. Альтернативно, эпитоп может представлять собой конформационный эпитоп, содержащий или состоящий из двух или более аминокислот, которые не расположены рядом друг с другом в последовательности первичного белка галектина-10. В тех вариантах, в которых антагонист связывается с конформационным эпитопом, две или более аминокислот эпитопа обычно будут расположены в непосредственной близости в трехмерной структуре белка галектина-10. Эпитопы, с которыми связываются антагонисты галектина-10 согласно изобретению, могут содержать, или состоять из них, по меньшей мере две аминокислоты, по меньшей мере три аминокислоты, по меньшей мере четыре аминокислоты, по меньшей мере пять аминокислот, по меньшей мере шесть аминокислот, по меньшей мере семь аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эпитопы, с которыми связываются антагонисты галектина-10, включают или состоят из них, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

Антагонисты согласно изобретению связываются с эпитопом галектина-10 и тем самым экранируют пограничный слой упаковки кристаллов галектина-10. Как определено в настоящем изобретении, пограничный слой упаковки кристаллов галектина-10 представляет собой поверхностный участок аминокислот, который контактирует с одной или более соседними молекулами галектина-10 в кристаллической решетке. При связывании с эпитопом галектина-10, который служит для экранирования пограничного слоя упаковки кристаллов галектина-10, антагонисты согласно изобретению нарушают кристаллизацию галектина-10. Отсюда следует, что антагонисты согласно изобретению могут полностью или частично экранировать пограничный слой упаковки кристаллов при условии, что антагонист будет нарушать кристаллизацию галектина-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонисты, если они связываются с растворимым галектином-10, ингибируют кристаллизацию галектина-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонисты, если они связываются с кристаллическим галектином-10, способствуют растворению галектина-10.

Антагонистические свойства описанных здесь антагонистов галектина-10 могут быть оценены с помощью описанных здесь анализов. Так, например, антагонисты галектина-10, включая антитела к галектину-10, могут быть инкубированы с растворимым галектином-10 в экспериментальных условиях, которые благоприятствуют кристаллизации галектина-10, а затем может быть оценена способность антагонистов ингибировать этот процесс. Ингибирующая активность антагонистов галектина-10 может быть определена по отношению к контролю, например, к антагонисту, который не связывается с галектином-10. Ингибирующая активность антагонистов галектина-10 также может быть определена по отношению к контролю, то есть, к молекуле, связывающейся с галектином-10, но не обладающей активностью в ингибировании кристаллизации. Антагонисты галектина-10 могут ингибировать кристаллизацию галектина-10 на 100% по отношению к контролю, на 90% по отношению к контролю, на 80% по отношению к контролю или на 70% по отношению к контролю.

Альтернативно, антагонисты галектина-10, включая антитела к галектину-10 и антигенсвязывающие фрагменты, могут быть инкубированы с предварительно полученными кристаллами галектина-10, и способность антагонистов растворять кристаллы может быть оценена в течение соответствующего периода времени. Кристаллы галектина-10 могут быть рекомбинантными кристаллами, образованными из рекомбинантного галектина-10, полученного *in vitro*. Альтернативно, кристаллы галектина-10 могут представлять собой кристаллы, полученные из образца, взятого у пациента, например, кристаллы, выделенные из полипов в носовой полости или в полостях носовых пазух пациента. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонисты галектина-10 согласно изобретению могут растворять уже образовавшиеся кристаллы галектина-10 в течение периода времени до 10 ч, до 12 ч, до 14 ч, до 16 ч, до 18 ч, до 20 ч. Антагонисты галектина-10 могут растворять кристаллы полностью, то есть, на 100%. Альтернативно, антагонисты галектина-10 могут растворять кристаллы таким образом, что в результате будет растворяться более 50% кристаллов, более 60% кристаллов, более 70% кристаллов, более 80% кристаллов, более 90% кристаллов в течение определенного периода времени.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонист галектина-10 экранирует пограничный слой упаковки кристаллов посредством связывания с эпитопом, содержащим одну или более аминокислот пограничных слоев упаковки кристаллов галектина-10. Аминокислоты галектина-10, которые образуют пограничные слои упаковки кристаллов, обычно идентифицируются как: Ser2, Leu3, Leu4, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Ala12, Ser13, Thr16, Thr42, Glu43, Met44, Lys45, Asp49, Ile50, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Leu96, Pro97, Asp98, Lys99, Gln101, Met103, Gly106, Gln107, Ser108, Ser109, Tyr110, Thr111, Asp113, His114, Arg115, Ile116, Lys117, Ala120, Gln125, Thr133, Lys134, Phe135, Asn136, Val137, Ser138, Tyr139, Leu140 и Lys141, где положения определены со ссылкой на SEQ ID NO: 141. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонисты галектина-10 согласно изобретению связываются с эпитопом, содержащим одну

или более, две или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из Ser2, Leu3, Leu4, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Ala12, Ser13, Thr16, Thr42, Glu43, Met44, Lys45, Asp49, Ile50, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Leu96, Pro97, Asp98, Lys99, Gln101, Met103, Gly106, Gln107, Ser108, Ser109, Tyr110, Thr111, Asp113, His114, Arg115, Ile116, Lys117, Ala120, Gln125, Thr133, Lys134, Phe135, Asn136, Val137, Ser138, Tyr139, Leu140 и Lys141. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эпитоп полностью состоит из аминокислот пограничных слоев упаковки кристаллов галектина-10. Так, например, эпитоп может состоять из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот пограничных слоев упаковки кристаллов галектина-10. Альтернативно, эпитоп может содержать аминокислоты пограничных слоев упаковки кристаллов и дополнительно содержит по меньшей мере одну аминокислоту за пределами аминокислот пограничных слоев упаковки кристаллов галектина-10.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим Tyr69. Альтернативно или дополнительно, антагонист может предпочтительно связываться с эпитопом, содержащим аминокислоту, смежную с Tyr69, а в частности, Glu68 или Gly70. В одном варианте осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим Glu68, Tyr69 и Gly70.

В конкретном варианте осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислот: Thr42, Glu43, Lys45, Asp49, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, His114, Arg115, Ile116, Lys117 и Ala120. В конкретном варианте осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислот: Thr42, Glu43, Lys45, Asp49, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, His114, Arg115, Ile116, Lys117, Glu119, Ala120 и Lys122. В конкретных вариантах осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислот: Thr42, Glu43, Lys45, Asp49, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, Gln74, Asp98, His114, Arg115, Ile116, Lys117, Glu119, Ala120 и Lys122.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим аминокислоты: Glu33, Gly59, Arg60 и Lys79. Эпитоп может дополнительно содержать аминокислоты: Gln74, Gln75 и Glu77.

В конкретном варианте осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислот: Leu31, Glu33, Gly59, Arg60, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Pro82 и Gln84. В конкретном варианте осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислот: Glu33, Gly59, Arg60, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Pro82 и Ser109. В конкретном варианте осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислот: Glu33, Gly59, Arg60, Trp72, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Lys79, Asn80, Met81, Pro82, Gln84 и Ser109. В конкретном варианте осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислот: Glu33, Gly59, Arg60, Gln74, Gln75, Val76, Glu77, Ser78, Lys79, Asn80, Met81, Pro82, Phe83, Gln84.

В альтернативном варианте осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислот: Thr42, Asp49, Glu68, Tyr69, Gly70, Ala71, Lys73, Arg115, Ile116, Lys117, Glu119 и Ala120. В другом варианте осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислот: Glu43, Asp49, Glu68, Tyr69, Lys73, Asp98, Asp113, His114, Arg115, Lys117, Glu119 и Ala120. В другом варианте осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислот: Asp49, Glu68, Tyr69, Lys73, Gln74, Asp98, Asp113, His114, Arg115, Ile116 и Lys117. В другом варианте осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим или состоящим из аминокислот: Ser2, Leu3, Leu4, Pro5, Pro7, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Lys23, Arg25, Met44, Gly86, Gln87, Glu88, Phe89, Glu90, Asn105, Gln125, Thr133, Lys134 и Phe135.

Аминокислотные положения галектина-10 идентифицированы по отношению к человеческому белку, представленному как SEQ ID NO: 141.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонист связывается с эпитопом, содержащим одну или более аминокислот пограничного слоя димеризации галектина-10. Аминокислоты галектина-10, которые образуют домен димеризации, могут отличаться от аминокислот, которые участвуют в образовании пограничных слоев упаковки кристаллов. Однако, антагонист, который связывается с аминокислотами, расположенными в пограничном слое димеризации, может также экранировать пограничные слои упаковки кристаллов, и тем самым нарушать кристаллизацию галектина-10. Аминокислоты галектина-10, которые образуют пограничный слой димеризации, обычно идентифицируют как: Pro5, Pro7, Leu27, Ala28, Cys29, Leu31, Asn32, Glu33, Pro34, Tyr35, Gln37, His41, Glu46, Glu47, Gln55, Arg60, Arg61, Arg67, Trp72, Gln75, Trp127, Arg128 и Asp129. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонисты галектина-10 согласно изобретению связываются с эпитопом, содержащим или состоящим из одной или более, двух или более, трех или более, четырех или более, пяти или более, шести или более, семи или более, восьми или более, девяти или более, десяти или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из: Pro5, Pro7, Leu27, Ala28, Cys29, Leu31, Asn32, Glu33, Pro34,

Tyr35, Gln37, His41, Glu46, Glu47, Gln55, Arg60, Arg61, Arg67, Trp72, Gln75, Trp127, Arg128 и Asp129. Аминокислотные положения галектина-10 определены в соответствии с SEQ ID NO: 141.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонисты галектина-10 согласно изобретению связываются с эпитопом галектина-10, содержащим одну или более аминокислот пограничных слоев упаковки кристаллов и одну или более аминокислот пограничного слоя димеризации. Одна или более аминокислот пограничных слоев упаковки кристаллов и одна или более аминокислот пограничного слоя димеризации могут представлять собой любые конкретные аминокислоты, указанные выше. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, антагонисты согласно изобретению связываются с эпитопом, содержащим Glu68, Tyr69 и Gly70.

С. Антитела к галектину-10 и их антигенсвязывающие фрагменты.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, антагонисты галектина-10 согласно изобретению представляют собой антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Термин "антитело" используется здесь в самом широком смысле и включает, но не ограничивается ими, моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), антитела с VHH, при условии, что они обладают соответствующей иммунологической специфичностью к белку галектину-10. Описанные здесь антитела к галектину-10 и их антигенсвязывающие фрагменты могут обладать иммунологической специфичностью к любому из эпитопов галектина-10, описанных выше в разделе В.

Используемый здесь термин "моноклональное антитело" означает антитело, полученное из популяции по существу гомогенных антител, то есть, отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются в высокой степени специфичными и направлены на один антигенный сайт. Кроме того, в отличие от обычных (поликлональных) препаратов антител, которые обычно включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов) антигена, каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты или эпитопа антигена. "Фрагменты антитела" или "антигенсвязывающие фрагменты" включают часть полноразмерного антитела, обычно его антигенсвязывающий или вариабельный домен. Фрагменты антител описаны в настоящем изобретении, и примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, биспецифические Fab' и Fv-фрагменты, диантитела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) и мультиспецифические антитела, образованные фрагментами антител (см., публикацию Holliger and Hudson, Nature Biotechnol. 23:1126-36 (2005), содержание которой вводится в настоящее описание посредством ссылки).

Описанные здесь антитела к галектину-10 и их антигенсвязывающие фрагменты предназначены для терапевтического лечения человека, а следовательно, обычно представляют собой иммуноглобулины типа IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, обычно типа IgG, и в этом случае, они могут принадлежать к любому из четырех подклассов IgG1, IgG2a и b, IgG3 или IgG4. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, антитела к галектину-10 представляют собой антитела IgG. Особенно предпочтительными являются антитела IgG1. Моноклональные антитела являются предпочтительными, поскольку они в высокой степени специфичны и направлены на один антигенный сайт. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения, антигенсвязывающие фрагменты галектина-10 представляют собой Fab-фрагменты или "Fab".

Антитела к галектину-10 и их антигенсвязывающие фрагменты могут обладать высокой гомологией с человеческим антителом, как определено в настоящем изобретении. Такие молекулы антител, имеющие высокую гомологию с человеческим антителом, могут включать антитела, содержащие домены VH и VL нативных нечеловеческих антител, которые демонстрируют достаточно высокий % идентичности последовательностей с последовательностями зародышевой линии человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой гуманизованные или зародышевые варианты нечеловеческих антител.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела к галектину-10 и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении, могут происходить от верблюдовых. Антитела, происходящие от верблюдовых, могут представлять собой антитела только с тяжелой цепью, то есть, антитела с VHH, или они могут быть обычными гетеротетрамерными антителами. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, антитела к галектину-10 и их антигенсвязывающие фрагменты происходят от верблюжьих гетеротетрамерных антител. В других предпочтительных вариантах осуществления изобретения, антитела к галектину-10 являются антителами с VHH или происходят от антител с VHH.

Так, например, антитела к галектину-10 и антигенсвязывающие фрагменты могут быть выбраны из иммунных библиотек, полученных способом, включающим стадию иммунизации верблюда представляющей интерес мишенью, например галектином-10. Верблюд может быть иммунизован белком-мишенью или его полипептидным фрагментом, или молекулой мРНК или молекулой кДНК, экспрессирующей белок или его полипептидный фрагмент. Способы получения антител у верблюдовых и отбора антител против предпочтительных мишеней из иммунных библиотек верблюдовых описаны, например, в

Международной патентной заявке № WO 2010/001251, которая вводится в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела к галектину-10 и их антигенсвязывающие фрагменты могут происходить от верблюдовых, поскольку они содержат по меньшей мере одну гипервариабельную (HV) петлю или комплементарность-определяющую область, полученную из домена VH или домена VL животных семейства Верблюдовых. В частности, антитела к галектину-10 и их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать домены VH и/или VL или их CDR, полученные в результате активной иммунизации аутбредных верблюдовых, например лам, галектином-10.

Термин "полученный из" в данном контексте означает структурную взаимосвязь в том смысле, что HV или CDR антител включают аминокислотную последовательность (или ее минорные варианты), которая по своей природе кодируется геном иммуноглобулина верблюдовых. Однако, при этом, не обязательно подразумевается конкретная взаимосвязь с точки зрения способа продуцирования, применяемого для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

Антитела, происходящие от верблюдовых, или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены от любых видов верблюдовых, включая, *inter alia*, ламу, дромедара, альпаку, викунью, гуанако или верблюда.

Молекулы антител, содержащие домены VH и VL или их CDR, происходящие от верблюдовых, обычно представляют собой рекомбинантно экспрессируемые полипептиды и могут быть химерными полипептидами. Термин "химерный полипептид" означает искусственный (не встречающийся в природе) полипептид, который был получен путем объединения в юстаположении двух или более пептидных фрагментов, которые в природе не являются смежными. В это определение включены "виды" химерных полипептидов, созданных путем объединения в юстаположении пептидных фрагментов, кодируемых генами двух или более видов, например верблюдов и человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, весь домен VH и/или весь домен VL может быть получен от животных семейства Верблюдовых. Домен VH, происходящий от верблюдовых и/или домен VL, происходящий от верблюдовых, может быть затем подвергнут белковой инженерии, где одну или более аминокислотных замен, инсерций или делеций вводят в аминокислотную последовательность верблюда. Эти сконструированные модификации предпочтительно включают аминокислотные замены, введенные в последовательность верблюда. Такие модификации включают "гуманизацию" или "получение зародышевой линии", где один или более аминокислотных остатков в кодируемом домене VH или VL верблюдов заменены эквивалентными остатками гомологичного домена VH или VL, кодируемого у человека.

Выделенные у верблюдов домены VH и VL, полученные путем активной иммунизации верблюда (например, ламы) галектином-10, могут быть использованы в качестве основы для конструирования антител к галектину-10 и их антигенсвязывающих фрагментов согласно изобретению. С использованием интактных доменов VH и VL верблюдов можно ввести одну или более аминокислотных замен, инсерций или делеций, которые отличаются от исходной последовательности верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такие замены, инсерции или делеции могут присутствовать в каркасных областях домена VH и/или домена VL.

В других своих вариантах, настоящее изобретение относится к "химерным" молекулам антител, содержащим VH- и VL-домены, полученные от верблюдовых (или их сконструированные варианты), и один или более константных доменов не-верблюжьего антитела, например, константные домены, кодируемые у человека (или сконструированные варианты). В таких вариантах осуществления изобретения, предпочтительно, чтобы домен VH и домен VL были получены от одного и того же вида верблюдовых, например, VH и VL могут быть получены от гламы, или оба VH и VL могут быть получены от паки (до введения сконструированного варианта аминокислотной последовательности). В таких вариантах осуществления изобретения, домен VH и домен VL могут происходить от одного животного, а в частности, от одного животного, которое было активно иммунизировано представляющим интерес антигеном.

В качестве альтернативы сконструированным модификациям, в первичной аминокислотной последовательности доменов VH и/или VL верблюдовых, отдельные гипервариабельные петли или CDR, происходящие от верблюдовых, или их комбинации, могут быть выделены из доменов VH/VL верблюдовых и перенесены в альтернативную каркасную область (то есть, не-верблюдовых), например, в человеческую каркасную область VH/VL, путем CDR-прививки.

В неограничивающих вариантах осуществления изобретения, антитела к галектину-10 могут содержать домены CH1 и/или домены CL (тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно), аминокислотная последовательность которых полностью или, по существу, является человеческой. Для молекул антител, предназначенных для терапевтического лечения человека, как правило, вся константная область антитела или по меньшей мере его часть имеет полностью или по существу человеческую аминокислотную последовательность. Следовательно, одна или более или любые комбинации домена CH1, шарнирной области, домена CH2, домена CH3 и домена CL (и домена CH4, если он присутствует) могут быть полностью или по существу человеческими по своим аминокислотным последовательностям. Домен CH1, шарнирная область, домен CH2, домен CH3 и/или домен CL (и/или домен CH4, если он присутствует) могут проис-

ходить от человеческого антитела, предпочтительно от человеческого антитела IgG, а более предпочтительно, человеческого антитела IgG1 подтипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Преимущественно, домен СН1, шарнирная область, домен СН2, домен СН3 и домен CL (и домен СН4, если он присутствует) могут иметь полностью или по существу человеческую аминокислотную последовательность. Что касается константной области гуманизованного или химерного антитела или фрагмента антитела, то термин "по существу человеческий" означает, что аминокислотная последовательность по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 92%, или по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 97%, или по меньшей мере на 99% идентична человеческой константной области. Термин "человеческая аминокислотная последовательность" в этом контексте означает аминокислотную последовательность, которая кодируется геном иммуноглобулина человека, включая гены зародышевой линии, реаранжированные и соматически мутированные гены. Настоящее изобретение также охватывает полипептиды, содержащие константные домены "человеческой" последовательности, которые были модифицированы путем введения одного или более добавлений, делеций или замен аминокислот в человеческую последовательность за исключением вариантов, в которых необходимо присутствие "полностью человеческой" шарнирной области.

Антитела к галектину-10 могут иметь одну или более аминокислотных замен, инсерций или делеций в константной области тяжелой и/или легкой цепи, а в частности, в области Fc. Аминокислотные замены могут приводить к замене заменяемой аминокислоты другой природной аминокислотой или неприродной или модифицированной аминокислотой. Также допускаются и другие структурные модификации, такие как, например, изменения в паттерне гликозилирования (например, путем добавления или удаления сайтов N- или O-связанного гликозилирования).

Антитела к галектину-10 могут быть модифицированы в Fc-области для повышения аффинности связывания с неонатальным рецептором FcRn. Повышенная аффинность связывания может быть оценена при кислотном pH (например, приблизительно при pH от 5,5 до приблизительно pH 6,0). Повышенная аффинность связывания может быть также оценена при нейтральном pH (например, приблизительно при pH от 6,9 до приблизительно pH 7,4). Термин "повышенная аффинность связывания" означает повышенную аффинность связывания с FcRn по сравнению с немодифицированной Fc-областью. Обычно, немодифицированная Fc-область будет иметь аминокислотную последовательность дикого типа человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В таких вариантах осуществления изобретения, повышенная аффинность связывания молекулы антитела, имеющей модифицированную область Fc, с FcRn, будет определена по сравнению с аффинностью связывания IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа с FcRn.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, один или более аминокислотных остатков в области Fc могут быть заменены другой аминокислотой для повышения уровня связывания с FcRn. Сообщалось, что несколько замен Fc будут повышать уровень связывания с FcRn и тем самым улучшать фармакокинетику антител. Такие замены описаны, например, в публикациях Zalevsky et al. (2010) *Nat. Biotechnol.* 28(2):157-9; Hinton et al. (2006) *J Immunol.* 176:346-356; Yeung et al. (2009) *J Immunol.* 182:7663-7671; Presta LG. (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:460-470; and Vaccaro et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23(10): 1283-88, содержание которых полностью включено в настоящий документ.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела к галектину-10 содержат модифицированный Fc-домен человеческого IgG, содержащий, или состоящий из них, аминокислотные замены H433K и N434F, где нумерация Fc-домена соответствует нумерации EU. В дополнительном варианте осуществления изобретения, описанные здесь антитела к галектину-10 содержат модифицированный Fc-домен человеческого IgG, содержащий, или состоящий из них, аминокислотные замены M252Y, S254T, T256E, H433K и N434F, где нумерация Fc-домена соответствует нумерации EU.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела к галектину-10 содержат модифицированный Fc-домен человеческого IgG, состоящий из замен в количестве до 2, до 3, до 4, до 5, до 6, до 7, до 8, до 9, до 10, до 12, до 15, до 20 по сравнению с соответствующей последовательностью IgG дикого типа.

Антитела к галектину-10 могут быть также модифицированы с образованием иммуноконъюгатов, содержащих антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический агент, токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или их фрагменты), или радиоактивный изотоп (то есть, радиоконъюгат). Fc-области также могут быть сконструированы для увеличения времени полужизни, как описано в публикации Chan and Carter (2010) *Nature Reviews: Immunology* 10: 301-316, включенной в настоящее описание посредством ссылки.

В еще одном варианте осуществления изобретения, Fc-область модифицируют для повышения способности антитела опосредовать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для повышения аффинности антитела к рецептору Fcγ путем модификации одной или более аминокислот.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, Fc-область может быть сконструирована так, чтобы она не обладала эффекторной функцией. В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекулы антител согласно изобретению могут иметь Fc-область, происходящую от встречающихся в природе изоформ IgG, имеющих пониженную эффекторную функцию, например IgG4. Fc-области, проис-

ходящие от IgG4, могут быть дополнительно модифицированы для повышения их терапевтической ценности, например, путем введения модификаций, которые минимизируют обмен ветвями между молекулами IgG4 *in vivo*. Fc-области, происходящие от IgG4, могут быть модифицированы для включения замены S228P.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекулы антител модифицируют в отношении гликозилирования. Так, например, может быть получено агликозилированное антитело (то есть, чтобы это антитело было негликозилированным). Гликозилирование может быть модифицировано, например, для повышения аффинности связывания антитела с антигеном-мишенью. Такие углеводные модификации могут быть осуществлены, например, путем изменения одного или более сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Так, например, могут быть введены одна или более аминокислотных замен, которые приводят к элиминации одного или более сайтов гликозилирования каркасной вариабельной области, и тем самым к элиминации гликозилирования в этом сайте. Такое агликозилирование может повышать аффинность связывания антитела с антигеном.

Также рассматриваются варианты антител к галектину-10, имеющие измененный тип гликозилирования, такие как гипофукозилированное антитело, имеющее пониженное количество фукозильных остатков, или полностью или частично дефукозилированное антитело (как описано Natsume et al., Drug Design Development and Therapy, Vol.3, pp7-16, 2009) или антитело, имеющее более высокое содержание двухкомпонентных структур GlcNac. Было продемонстрировано, что такие измененные паттерны гликозилирования повышают ADCC-активность антител, обычно в 10 раз по сравнению с эквивалентным антителом, содержащим "нативный" человеческий Fc-домен. Такие углеводные модификации могут быть осуществлены, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным ферментативным механизмом гликозилирования (как описано Yamane-Ohnuki and Satoh, mAbs 1: 3, 230-236, 2009). Примерами нефукозилированных антител с усиленной ADCC-функцией являются антитела, полученные с применением технологии Potelligent™ BioWa Inc.

#### D. Репрезентативные антитела к галектину-10.

Настоящее изобретение относится к типичным антителам против галектина-10 и к их антигенсвязывающим фрагментам. Эти антитела против галектина-10 и антигенсвязывающие фрагменты служат в качестве предпочтительных антагонистов галектина-10 согласно изобретению. Типичные антитела к галектину-10 и антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению могут быть определены исключительно с точки зрения их структурных свойств, как описано ниже.

Настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с галектином-10, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL), где домены VH и VL содержат последовательности CDR, выбранные из группы, состоящей из:

(i) HCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 3; HCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 2; HCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 1; LCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 58; LCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 57; LCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 56;

(ii) HCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 6; HCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 5; HCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 4; LCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 61; LCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 60; LCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 59;

(iii) HCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 9; HCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 8; HCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 7; LCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 64; LCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 63; LCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 62;

(iv) HCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 12; HCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 11; HCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 10; LCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 67; LCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 66; LCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 65;

(v) HCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 15; HCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 14; HCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 13; LCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 70; LCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 69; LCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 68;

(vi) HCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 18; HCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 17; HCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 16; LCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 72; LCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 66; LCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 71;

(vii) HCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 20; HCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 19; HCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 4; LCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 75; LCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 74; LCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 73;



последовательность CDR2 варибельной тяжелой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 2 [GISWNGGSTYYAESMKG] или ее варианта;

последовательность CDR1 варибельной тяжелой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 1 [DYAMS] или ее варианта;

последовательность CDR3 варибельной легкой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 58 [ASYRSSNNAV] или ее варианта;

последовательность CDR2 варибельной легкой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 57 [EVNKRAS] или ее варианта;

последовательность CDR1 варибельной легкой цепи содержит SEQ ID NO: 56 [AGTSSDVGYG-NYVS] или ее варианта; и

где вариант последовательности содержит одну, две или три аминокислотные замены (например, консервативные замены, гуманизирующие замены или аффинные варианты) в указанной последовательности.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с галектином-10, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат варибельный домен тяжелой цепи и варибельный домен легкой цепи, где:

последовательность CDR3 варибельной тяжелой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 6 [PGDRLWYYRYDY] или ее варианта;

последовательность CDR2 варибельной тяжелой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 5 [AINSGGGSTSYADSVKG] или ее варианта;

последовательность CDR1 варибельной тяжелой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 4 [SYAMS] или ее варианта;

последовательность CDR3 варибельной легкой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 61 [ASYRYRNNVV] или ее варианта;

последовательность CDR2 варибельной легкой цепи включает или состоит из SEQ ID NO: 60 [KVSRRAS] или ее варианта;

последовательность CDR1 варибельной легкой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 59 [AG-TSSDIGYGNVVS] или ее варианта; и

где вариант последовательности содержит одну, две или три аминокислотные замены (например, консервативные замены, гуманизирующие замены или аффинные варианты) в указанной последовательности.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с галектином-10, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат варибельный домен тяжелой цепи и варибельный домен легкой цепи, где:

последовательность CDR3 варибельной тяжелой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 9 [YIRGSSWSGWSAYDY] или ее варианта;

последовательность CDR2 варибельной тяжелой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 8 [VI-ASDGSTYYSPSLKS] или ее варианта;

последовательность CDR1 варибельной тяжелой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 7 [TSYYAWS] или ее варианта;

последовательность CDR3 варибельной легкой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 64 [QSADSSDNPV] или ее варианта;

последовательность CDR2 варибельной легкой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 63 [KDSERPS] или ее варианта;

последовательность CDR1 варибельной легкой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 62 [QGGNFGYYYGS] или ее варианта; и

где вариант последовательности содержит одну, две или три аминокислотные замены (например, консервативные замены, гуманизирующие замены или аффинные варианты) в указанной последовательности.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с галектином-10, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат варибельный домен тяжелой цепи и варибельный домен легкой цепи, где

последовательность CDR3 варибельной тяжелой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 12 [RPNWYRALDA] или ее варианта;

последовательность CDR2 варибельной тяжелой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 11 [AIAYSGSTYYSPSLKS] или ее варианта;

последовательность CDR1 варибельной тяжелой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 10 [TNSYYWS] или ее варианта;

последовательность CDR1 варибельной легкой цепи содержит или состоит из SEQ ID NO: 67





из SEQ ID NO: 164; HCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 163; LCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 193; LCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 181; LCDR1, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 180.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с галектином-10, выбраны из молекул антител, содержащих, или состоящих из них, переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), выбранные из:

(i) VH, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и VL, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 195, или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%;

(ii) VH, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 196 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и VL, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 197, или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%;

(iii) VH, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 198 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и VL, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 199, или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%;

(iv) VH, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 200 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и VL, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 201, или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%;

(v) VH, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 202 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и VL, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 203, или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%;

(vi) VH, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 204 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и VL, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 205, или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%; и

(vii) VH, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 206 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и VL, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 207, или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%.

Для вариантов осуществления изобретения, в которых домены антител или их антигенсвязывающих фрагментов определяются конкретным процентом идентичности последовательности с эталонной последовательностью, домены VH и/или VL могут сохранять последовательности CDR, идентичные последовательностям, присутствующим в эталонной последовательности, так, чтобы изменение присутствовало только в каркасных областях.

Настоящее изобретение относится к антителу или к его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с галектином-10, где антитело представляет собой антитело с VHH, и где домен VHH содержит последовательности CDR, выбранные из группы, состоящей из:

(i) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 210; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 209; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 208;

(ii) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 213; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 212; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 211;

(iii) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 216; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 215; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 214;

(iv) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 219; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 218; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 217;

(v) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 222; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 221; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 220;

(vi) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 225; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 224; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 223;

(vii) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 228; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 227; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 226;

(viii) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 231; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 230; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 229;

(ix) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 234; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 233; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 232;

(x) CDR3, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 236; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 235; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 226;

- (xi) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 238; CDR2, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 237; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 232;
- (xii) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 241; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 240; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 239;
- (xiii) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 236; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 235; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 226;
- (xiv) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 244; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 243; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 242;
- (xv) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 234; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 233; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 232;
- (xvi) CDR3, содержащий или состоящий из SEQ ID NO: 247; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 246; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 245; и
- (xvii) CDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 249; CDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 248; CDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 217.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела с VHH, которые связываются с галектином-10, содержат домен VHH, включающий или состоящий из них, выбранные молекулы антитела, содержащие или состоящие из нее, аминокислотную последовательность, представленную любой из SEQ ID NO: 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265 или 266, или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%.

Для вариантов осуществления изобретения, в которых домены VHH определяются конкретным процентом идентичности последовательности с эталонной последовательностью, домен VHH может сохранять последовательности CDR, идентичные последовательностям, присутствующим в эталонной последовательности, так, чтобы изменение присутствовало только в каркасных областях.

Настоящее изобретение также относится к антителам или к их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с таким же эпитопом, как и антитела к галектину-10, приведенные здесь в качестве примеров.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, репрезентативные антитела к галектину-10 и их антигенсвязывающие фрагменты, определенные как последовательности, имеющие CDR, указанные выше, или определенные как последовательности, имеющие определенный процент идентичности с указанными выше конкретными аминокислотными последовательностями домена VH/VL/VHH, представляют собой гуманизованные, зародышевые или аффинные варианты антител или их антигенсвязывающие фрагменты, от которых происходят последовательности CDR, VH, VL и/или VHH.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения, репрезентативные молекулы антитела к галектину-10, имеющие последовательности CDR, указанные выше, обнаруживали высокую гомологию с человеческой последовательностью, например, они представляют собой гуманизованные или зародышевые варианты антител или их антигенсвязывающих фрагментов, от которых происходят последовательности CDR.

В неограничивающих вариантах осуществления изобретения, репрезентативные антитела к галектину-10 и их антигенсвязывающие фрагменты, имеющие описанные здесь последовательности CDR, VH и/или VL, могут содержать домены CH1 и/или домены CL (тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно), аминокислотная последовательность которых полностью или, по существу, является человеческой. Для молекул антител, предназначенных для терапевтического лечения человека, обычно вся константная область антитела или по меньшей мере его часть имеет полностью или по существу человеческую аминокислотную последовательность. Следовательно, одна или более или любые комбинации домена CH1, шарнирной области, домена CH2, домена CH3 и домена CL (и домена CH4, если он присутствует) могут быть полностью или по существу человеческими по своим аминокислотным последовательностям.

Преимущественно, домен CH1, шарнирная область, домен CH2, домен CH3 и домен CL (и домен CH4, если он присутствует) могут иметь полностью или по существу человеческую аминокислотную последовательность. Что касается константной области гуманизованного или химерного антитела или фрагмента антитела, то термин "по существу человеческий" означает, что аминокислотная последовательность по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 92%, или по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 97%, или по меньшей мере на 99% идентична человеческой константной области. Термин "человеческая аминокислотная последовательность" в этом контексте означает аминокислотную последовательность, которая кодируется геном иммуноглобулина человека, включая гены зародышевой линии, реаранжированные и соматически мутированные гены. Настоящее изобретение также охватывает полипептиды, содержащие константные домены "человеческой" последовательности, которые были модифицированы путем введения одного или более добавлений, делеций или замен аминокислот в человеческую последовательность за исключением вариантов, в которых необходимо присутствие "полностью человеческой" шарнирной области. Любая из типичных модификаций Fc-области, описанных в настоящем изобретении, может быть включена в антитела к галектину-10, имеющие последовательности доменов CDR и/или VH/VL, указанные выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела к галектину-10, имеющие последовательности домена CDR и/или VH/VL, указанные выше, содержат мо-

дифицированный Fc-домен человеческого IgG, содержащий или состоящий из аминокислотных замен H433K и N434F, где нумерация Fc-домена соответствует нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитела к галектину-10, имеющие последовательности домена CDR и/или VH/VL, перечисленные выше, содержат модифицированный Fc-домен человеческого IgG, содержащий или состоящий из аминокислотных замен M252Y, S254T, T256E, H433K и N434F.

Если это не оговорено особо в настоящем изобретении, то % идентичности двух аминокислотных последовательностей может быть определен путем сравнения этих двух последовательностей, выровненных оптимальным способом, и при этом, сравниваемая аминокислотная последовательность может содержать добавления или делеции по сравнению с эталонной последовательностью для оптимального выравнивания этих двух последовательностей. Процент идентичности вычисляют путем определения числа идентичных положений, в которых аминокислотный остаток идентичен в двух последовательностях, с последующим делением этого числа идентичных положений на общее число положений в окне сравнения и умножения полученного результата на 100 с получением процента идентичности этих двух последовательностей. Так, например, можно использовать программу BLAST, "BLAST 2 sequences" (Tatusova et al., "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250), имеющуюся на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf7b12.html>, где использовались параметры по умолчанию (в частности для параметров "штраф за пробел-пропуск": 5, и "штраф за пробел-удлинение": 2; матрицей, выбранной для этой программы, является, например, матрица "BLOSUM 62"), и где процент идентичности двух сравниваемых последовательностей вычисляют непосредственно с помощью этой программы.

Е. Полинуклеотиды, кодирующие антитела к галектину-10.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидным молекулам, кодирующим антитела к галектину-10 согласно изобретению или их фрагменты. Настоящее изобретение относится к полинуклеотидным молекулам, кодирующим полноразмерные антитела к галектину-10, вместе с полинуклеотидными молекулами, кодирующими фрагменты, например, домены VH, VL и/или VHH описанных здесь антител к галектину-10. Настоящее изобретение также относится к экспрессионным векторам, содержащим указанные нуклеотидные последовательности согласно изобретению, функционально присоединенные к регуляторным последовательностям, которые позволяют экспрессировать антитела или их фрагменты в клетке-хозяине или в бесклеточной экспрессионной системе, и в клетке-хозяине или в бесклеточной экспрессионной системе, содержащей этот экспрессионный вектор.

Полинуклеотидные молекулы, кодирующие антитела к галектину-10 согласно изобретению, включают, например, рекомбинантные молекулы ДНК. Используемые здесь термины "нуклеиновая кислота", "полинуклеотид" или "полинуклеотидная молекула" являются синонимами и означают любую молекулу ДНК или РНК, одноцепочечную или двухцепочечную и, если она является одноцепочечной, то такая молекула имеет комплементарную последовательность. При обсуждении молекул нуклеиновой кислоты, может быть описана последовательность или структура конкретной молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с обычным соглашением о представлении последовательности в направлении от 5' до 3'. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды являются "выделенными". Этот термин, если он применяется к молекуле нуклеиновой кислоты, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая отделена от последовательностей, с которыми она непосредственно связана в природном геноме организма, от которого она происходит. Так, например, "выделенная нуклеиновая кислота" может содержать молекулу ДНК, встроенную в вектор, такой как плазмидный или вирусный вектор, или интегрированную в геномную ДНК прокариотической или эукариотической клетки или организма-хозяина, не являющегося человеком. Применительно к РНК, термин "выделенный полинуклеотид" относится, в первую очередь, к молекуле РНК, кодируемой выделенной молекулой ДНК, как определено выше. Альтернативно, этот термин может относиться к молекуле РНК, которая была очищена/отделена от других нуклеиновых кислот, с которыми она могла бы быть связана в своем природном состоянии (то есть, в клетках или в тканях). Выделенный полинуклеотид (ДНК или РНК) может также представлять собой молекулу, продуцируемую непосредственно биологическими или синтетическими способами и отделенную от других компонентов, присутствующих в процессе ее продуцирования.

Для рекомбинантного продуцирования антитела к галектину-10 согласно изобретению может быть получен рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий это антитело, или рекомбинантные полинуклеотиды, кодирующие различные цепи или домены (с применением стандартных методов молекулярной биологии) и встроенные в реплицируемый вектор для экспрессии в выбранной клетке-хозяине или в бесклеточной экспрессионной системе. Подходящими клетками-хозяевами могут быть прокариотические, дрожжевые или высшие эукариотические клетки, а в частности, клетки млекопитающих. Примерами подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почек обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия эмбриональных почек человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)); клетки почек детеныша хомячка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); мышечные клетки Сертоли (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); клетки мышечной миеломы SP2/0-AG14 (ATCC CRL 1581; ATCC CRL 8287)

или NSO (коллекции культур HPA № 85110503); клетки почек обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почек африканской зеленой марышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почек собак (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени лабораторной крысы (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли мышшиной молочной железы (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI-клетки (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; и линия человеческой гепатомы (Hep G2), а также клеточная линия PERC-6 DSM. Экспрессионные векторы, подходящие для их использования в каждой из этих клеток-хозяев, также широко известны специалистам в данной области.

Следует отметить, что термин "клетка-хозяин" обычно относится к культивируемой клеточной линии. Все люди, которым был введен экспрессионный вектор, кодирующий антигенсвязывающий полипептид согласно изобретению, полностью исключены из определения термина "клетка-хозяин".

#### Ф. Получение антител.

В своем дополнительном аспекте, настоящее изобретение также относится к способу получения антител согласно изобретению, который включает культивирование клетки-хозяина (или бесклеточной экспрессионной системы), содержащей полинуклеотид (например, экспрессионный вектор), кодирующий антитело в условиях, которые способствуют экспрессии антитела, и выделение экспрессированного антитела. Этот способ рекомбинантной экспрессии может быть применен для крупномасштабного продуцирования антител, включая антитела к галектину-10 согласно изобретению, включая моноклональные антитела, предназначенные для терапевтического лечения человека. Подходящие векторы, клеточные линии и способы крупномасштабного продуцирования рекомбинантных антител, подходящих для терапевтического применения *in vivo*, по существу, доступны и хорошо известны специалистам в данной области.

#### Г. Фармацевтические композиции.

В объем изобретения входят фармацевтические композиции, содержащие одно антитело или комбинацию антител к галектину-10 или их антигенсвязывающих фрагментов, вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями или наполнителями. Такие композиции могут включать одно антитело или комбинацию (например, двух или более) различных антител к галектину-10. Методы получения моноклональных антител для терапевтического лечения человека хорошо известны специалистам в данной области и подробно описаны, например, в публикации Wang et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol.96, pp1-26, 2007, содержание которой включено в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки.

Фармацевтически приемлемые наполнители, которые могут быть использованы для получения композиций, включают, но не ограничиваются ими, ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, белки сыворотки, такие как альбумин человеческой сыворотки, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, смеси частичных глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как сульфат протамина, динатрийбифосфат, бифосфат калия; хлорид натрия; соли цинка; коллоидную двуокись кремния; трисиликат магния; поливинилпирролидон; вещества на основе целлюлозы (например, натрий-содержащую карбоксиметилцеллюлозу); полиэтиленгликоль, полиакрилаты, воски, блоксополимеры полиэтилена-полиоксипропилена, полиэтиленгликоль и шерстяной жир.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции получают для введения индивидууму любым подходящим способом введения, включая, но не ограничиваясь ими, внутримышечную, внутривенную, интрадермальную, внутривнутрибрюшинную инъекцию, подкожное, эпидуральное, интраназальное, пероральное, ректальное, местное введение, введение путем ингаляции, трансбуккальное (например, подъязычное) и трансдермальное введение.

#### Н. Способы лечения.

Антагонисты галектина-10, а в частности, антитела к галектину-10 и его антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении, могут быть использованы в способах лечения. Таким образом, настоящее изобретение относится к антагонисту галектина-10 согласно первому аспекту изобретения для использования в качестве лекарственного средства. Альтернативно, настоящее изобретение относится к антагонисту галектина-10 согласно первому аспекту изобретения для использования в способе лечения. В своих предпочтительных вариантах, настоящее изобретение относится к антителам к галектину-10 и к их антигенсвязывающим фрагментам, описанным в настоящем изобретении, для их использования в качестве лекарственных средств. Альтернативно, настоящее изобретение относится к антителам к галектину-10 и к их антигенсвязывающим фрагментам, описанным в настоящем изобретении, для их использования в способе лечения. Антагонисты галектина-10, включая антитела к галектину-10 и их антигенсвязывающие фрагменты, для их использования в качестве лекарственных средств, обычно получают в виде фармацевтических композиций. Важно отметить, что все описанные выше варианты, относящиеся к антагонистам галектина-10, а в частности, к антителам против галектина-10 и их антигенсвязывающим фрагментам, в равной степени применимы к описанным здесь способам.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения индивидуума, нуждающегося в этом,

где указанный способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества антагониста галектина-10 согласно первому аспекту изобретения. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, антагонист галектина-10 представляет собой антитело к галектину-10 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем изобретении. В таких способах лечения, антагонисты галектина-10, включая антитела к галектину-10 и их антигенсвязывающие фрагменты, обычно получают в виде фармацевтических композиций. Используемый здесь термин "терапевтически эффективное количество" означает количество или дозу антагониста галектина-10, например антитела, которые являются достаточными для достижения терапевтического эффекта, например, количество или дозу антагониста, необходимые для устранения или по меньшей мере облегчения симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием. При необходимости, подходящее количество или подходящая доза могут быть определены врачом. Так, например, доза может быть скорректирована исходя из таких факторов, как размер или масса тела индивидуума, подвергаемого лечению, возраст индивидуума, подвергаемого лечению, общее физическое состояние индивидуума, подвергаемого лечению, состояние, подвергаемое лечению, и способ введения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, для клинического применения, антагонист галектина-10 представляет собой описанные здесь антитело к галектину-10 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые вводят индивидууму в виде одной или более доз приблизительно от 0,1 мг/кг массы тела и до приблизительно 20 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонист галектина-10 представляет собой описанные здесь антитело к галектину-10 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые вводят индивидууму в дозе приблизительно от 0,1 мг/кг массы тела и до приблизительно 10 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонист галектина-10 представляет собой описанные здесь антитело к галектину-10 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые вводят индивидууму в дозе приблизительно от 0,5 мг/кг массы тела и до приблизительно 10 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонист галектина-10 представляет собой описанные здесь антитело к галектину-10 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые вводят индивидууму в дозе приблизительно от 1 мг/кг массы тела и до приблизительно 10 мг/кг массы тела.

Антагонисты галектина-10, а в частности, антитела к галектину-10 и их антигенсвязывающие фрагменты, являются подходящими для их применения в терапевтических методах, поскольку они могут нарушать кристаллизацию галектина-10. Как объясняется в настоящем изобретении, антагонисты галектина-10 согласно изобретению связываются с эпитопом галектина-10, и тем самым экранируют пограничный слой упаковки кристаллов и, следовательно, нарушают кристаллизацию галектина-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонисты галектина-10 ингибируют кристаллизацию галектина-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антагонисты галектина-10 способствуют растворению кристаллического галектина-10.

Антагонисты галектина-10, включая антитела к галектину-10 и их антигенсвязывающие фрагменты, могут быть использованы для профилактики или лечения заболеваний или состояний, ассоциированных с присутствием или образованием кристаллов галектина-10 или CLC. Настоящее изобретение относится к способам профилактики или лечения заболевания или состояния, ассоциированного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10 или CLC у пациента или индивидуума, нуждающегося в этом, путем введения эффективного количества описанного здесь антагониста галектина-10, а в частности, антитела к галектину-10 или его антигенсвязывающего фрагмента.

Используемый здесь термин способ "профилактики" заболевания или состояния означает предотвращение начала развития заболевания, предотвращение ухудшения симптомов, предотвращение прогрессирования заболевания или состояния или снижение риска развития у индивидуума заболевания или состояния. Используемый здесь термин способ "лечения" заболевания или состояния означает излечение заболевания или состояния и/или ослабление или устранение симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием, что будет приводить к уменьшению страданий пациента.

Для пациентов, страдающих заболеваниями или состояниями, характеризующимися присутствием кристаллов галектина-10, способы лечения обычно включают введение антагониста галектина-10, предпочтительно антитела к галектину-10 или его антигенсвязывающего фрагмента, способных растворять кристаллы галектина-10 в тканях пациента. Для пациентов, идентифицированных как "подверженных риску" развития заболевания или состояния, характеризующегося образованием кристаллов галектина-10, способы профилактики могут включать введение антагониста галектина-10, предпочтительно, антитела к галектину-10 или его антигенсвязывающего фрагмента, способных ингибировать кристаллизацию галектина-10.

Кристаллы галектина-10 или CLC наблюдались у пациентов, страдающих целым рядом заболеваний и состояний. Отсюда следует, что антагонисты галектина-10, описанные в настоящем изобретении, могут быть использованы для профилактики или лечения заболеваний или состояний, выбранного из группы, состоящей из: астмы; хронического риносинусита; глютенной болезни; гельминтной инфекции; эозинофильного воспаления желудочно-кишечного тракта; кистозного фиброза (КФ); аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА); васкулита Черга-Штрауса; хронической эозинофильной пневмо-

нии; и острого миелоидного лейкоза. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, антитела к галектину-10 или их антигенсвязывающие фрагменты используют для профилактики или лечения заболевания или состояния, выбранного из группы, состоящей из: астмы; хронического риносинусита; глютеновой болезни; гельминтной инфекции; эозинофильного воспаления желудочно-кишечного тракта; кистозного фиброза (КФ); аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА); васкулита Черга-Штрауса; хронической эозинофильной пневмонии; и острого миелоидного лейкоза.

Как отмечалось выше, кристаллы галектина-10 или CLC, в частности, ассоциируются с заболеваниями или состояниями, характеризующимися эозинофильным воспалением. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, описанные здесь антагонисты галектина-10, предпочтительно антитела к галектину-10 или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении, используют для лечения расстройств или состояний, ассоциированных с эозинофильным воспалением.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления изобретения, описанные здесь антагонисты галектина-10, а предпочтительно антитела к галектину-10 или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем изобретении, используют для профилактики или лечения астмы.

Представленные здесь результаты подчеркивают важную роль CLC в индуцировании врожденного иммунного ответа и в индуцировании воспаления дыхательных путей *in vivo*. Эти эффекты были успешно устранены с помощью описанных здесь репрезентативных антител к галектину-10. Было обнаружено, что воспаление, наблюдаемое у описанной здесь мышинной модели, не зависит от комплекса NLRP3-инфламмосомы. Эти результаты впервые выявили причинную роль CLC в воспалительных ответах, опосредуемых путями, независимыми от NLRP3-инфламмосомы, то есть воспалительного комплекса, уже участвовавшего в патологии CLC. Отсюда следует, что способы согласно изобретению могут быть применены для лечения воспалительных состояний или расстройств, а в частности, воспалительных состояний или расстройств дыхательных путей. Терапевтический эффект может быть опосредован независимо от комплекса NLRP3-инфламмосомы.

Настоящее изобретение также относится к применению антагониста галектина-10 для детектирования галектина-10 в образце, взятом у пациента. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело к галектину-10 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению используют для детектирования галектина-10 в образце, взятом у пациента. Антагонисты, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты обычно используются для детектирования кристаллического галектина-10. Как отмечалось выше, кристаллы галектина-10 или кристаллы CLC наблюдались у пациентов, имеющих ряд различных заболеваний и состояний. Отсюда следует, что образец, взятый у пациента, может быть выделен у индивидуума, имеющего или, предположительно, имеющего любое из следующих заболеваний или состояний, а именно: астмы; хронического риносинусита; глютеновой болезни; гельминтной инфекции; эозинофильного воспаления желудочно-кишечного тракта; кистозного фиброза (КФ); аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА); васкулита Черга-Штрауса; хронической эозинофильной пневмонии; и острого миелоидного лейкоза. Детектирование кристаллического галектина-10 в образце пациента может быть применено для диагностики заболевания или состояния у индивидуума, у которого был взят образец. Образец может быть любым подходящим образцом, взятым у пациента, например, любой жидкостью или тканью, в которых наблюдаются CLC при патологическом состоянии. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образец представляет собой образец ткани, выделенный из полипа, например, полипа носовой полости. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образец представляет собой образец слизи. В таких вариантах осуществления изобретения, детектирование кристаллического галектина-10 в образце слизи с использованием антагонистов согласно изобретению может быть применено для обнаружения или диагностики хронического риносинусита. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, образец, взятый у пациента, представляет собой образец мокроты. В таких вариантах осуществления изобретения, детектирование кристаллического галектина-10 в образце мокроты с использованием антагонистов согласно изобретению может быть применено для обнаружения или диагностики астмы.

#### 1. Наборы.

Любой из антагонистов галектина-10, антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем изобретении, может быть упакован в виде набора и может, но необязательно, включать инструкции по применению.

### Примеры

Настоящее изобретение будет более понятно со ссылкой на нижеследующие неограничивающие примеры.

Пример 1. Получение рекомбинантных кристаллов Шарко-Левдена (CLC).

Предыдущие исследования CLC были проведены на кристаллах, полученных посредством аутокристаллизации богатых белком лизатов первичных эозинофилов крови человека или клеточных линий лейкоза, с последующей совместной очисткой от контаминирующих белков, таких как лизофосфолипаза (Ackerman et al. (1980); Weller и др. (1984) и Archer et al. (1965)).

Для получения большого количества чистых кристаллов CLC в целях их использования в функциональных исследованиях *in vivo*, человеческий галектин-10, несущий TEV-расщепляемую N-концевую

His-метку, был получен в *E. coli* и очищен с помощью комбинации аффинной хроматографии с иммобилизацией и эксклюзионной хроматографии (фиг. 1А). Синтетическая оптимизированная по кодонам последовательность ДНК, кодирующая человеческий галектин-10 (остатки 1-142, Uniprot Q05315), была клонирована в сайты NcoI/XhoI бактериального экспрессионного вектора pET28a (Novagen, cat#69864-3), содержащего His-метку и два сайта расщепления протеазой, энтерокиназу (DDDDK) и протеазу TEV (ENLYFQG) на N-конце (MASTTNNNNNNHDTDIPTGGGSRPDDDD-KENLYFQGHM). pET28a-галектин-10 переносили в клетки BL21 (DE3) с использованием канамицина (25 мкг/мл) в качестве маркера отбора. Экспрессионные культуры выращивали при -28°C в среде Лурия-Бертани, содержащей канамицин (25 мкг/мл). Экспрессию галектина-10 индуцировали в культуре при OD<sub>600</sub>=0,6 путем добавления изопропил-β-Д-тиогалактопиранозид (ИТПГ) до конечной концентрации 1 мМ, после чего культуру оставляли для размножения в течение ночи. Бактерии собирали центрифугированием (6000×g в течение 20 мин при 4°C), и клеточную пасту хранили при -80°C. Бактериальный осадок оттаивали и ресуспендировали в буфере для лизиса (50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 мМ NaCl, pH 7,4). Клетки лизировали путем обработки ультразвуком на ультразвуковом устройстве Брэнсона (общее время работы 4 мин с 30-секундными импульсами при 30% выходе, чередующимися с 30-секундным временем простоя). Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 4°C (20000×g в течение 30 мин). Супернатант осветляли фильтрованием с использованием 0,22 мкм-фильтра на крышке бутылки и загружали на колонку с Ni-сефарозой, уравновешенную 50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 мМ NaCl, pH 7,4. Затем колонку промывали загрузочным буфером с добавлением 20 мМ имидазола и 0,1% детергента Emprigen с последующей промывкой загрузочным буфером с добавлением 20 мМ имидазола. Затем белок элюировали с использованием загрузочного буфера с добавлением 50 мМ и 500 мМ имидазола. Пики элюирования 50 мМ и 500 мМ объединяли, концентрировали и вводили в колонку HiLoad 16/600 Superdex 200 pg, с использованием PBS pH 7,4 в качестве рабочего буфера. Фракции элюирования, соответствующие галектину-10, объединяли и хранили при -80°C. Уровни эндотоксина определяли как рекомбинантный белок с уровнем ЭЕ ниже 5 мг<sup>-1</sup> с использованием системы Endosafe-PTS (Charles River). His-меченный белок галектин-10 растворялся до концентрации 30 мг/мл.

Для анализа молекулярной массы и олигомерного состояния His-меченного галектина-10 был проведен SEC-MALLS (фиг. 1В). Образцы белка (100 мкл) вводили в колонку Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) с использованием PBS, pH 7,4, в качестве рабочего буфера при 0,5 мл/мин<sup>-1</sup>, подключенную к УФ-детектору в режиме онлайн (Shimadzu), к мультиугловому прибору со светорассеянием miniDAWN TREOS (Wyatt) и к рефрактометру Optilab T-gEX (Wyatt) при 25°C. Величину приращения показателя преломления (dn/dc) 0,185 мл/г<sup>-1</sup> использовали для определения концентрации и молекулярной массы белка. Данные анализировали с помощью программы ASTRA6 (Wyatt). Поправка на расширение полосы была применена с использованием параметров, полученных для BSA, введенного в идентичных рабочих условиях. Анализ SEC-MALLS показал, что His-меченный галектин-10 представляет собой димер в растворе (фиг. 1В). Определенная молекулярная масса составляла 40±0,8 кДа, что почти соответствует теоретической массе меченного димерного галектина-10 размером 41,2 кДа.

Для получения кристаллов рекомбинантного галектина-10, меченный по N-концу галектин-10 (в концентрации от 2 до 4,5 мг/мл), инкубировали с протеазой TEV, полученной в лаборатории (Kapust et al., 2001). Плазмида pRK793, кодирующая His-меченную TEV, была любезно предоставлена David Waugh (плазмида Addgene #8827). После гидролиза в течение ночи, раствор белка перемешивали с перемешиванием 5 раз, после чего раствор становился мутным приблизительно через 30 мин из-за спонтанного образования игольчатых кристаллов CLC (фиг. 1С). После TEV-расщепления, рекомбинантный галектин-10 аутокристаллизовался в буфере PBS и растворялся только до концентрации 0,2 мг/мл. После TEV-расщепления, на N-конце (GHM) рекомбинантного галектина-10 оставалось три остатка. Кристаллы очень напоминали различные макроскопические формы, первоначально описанные Шарко и фон Лейде-ном (фиг. 1D).

Были также получены флуоресцентно меченые формы кристаллов галектина-10. Поскольку галектин-10 содержит два цистеиновых остатка, подверженных действию растворителя (Cys29 и Cys57), то реагирующий с тиолом флуоресцентный краситель 5-йодацетиамидофлуоресцеин (5-IAF) использовали для флуоресцентного мечения галектина-10. 5-IAF солибилизировали в 100% диметилформамиде до концентрации 100 мМ. pH раствора белка галектина-10 (~5 мг/мл) доводили до pH 8,5 путем добавления 100 мМ триса pH 8,5 (с использованием 1М исходного раствора триса, pH 8,5). Затем к раствору белка добавляли 10-кратный молярный избыток 5-IAF по отношению к галектину-10 (мономеру), и реакцию мечения проводили в темноте при комнатной температуре в течение 2 ч. Для галектина-10, несущего N-концевую His-метку, коэффициент молярной экстинкции составлял 21430 см<sup>-1</sup> М<sup>-1</sup>. Затем избыток непрореагировавшего 5-IAF гасили добавлением 5 мМ DTT (с использованием 1М DTT). Затем избыток 5-IAF удаляли путем пропускания образца на обессоливающей 50 мл-колонке HiTrap (GE Healthcare) с использованием PBS в качестве рабочего буфера. Затем 5-IAF-меченный галектин-10 концентрировали и вводили в колонку с 200 pg Superdex HiLoad 16/600. Затем фракции пика элюирования объединяли и хранили при -80°C. Уровни эндотоксина определяли как рекомбинантный белок с уровнем ЭЕ ниже 5 мг<sup>-1</sup> с использованием системы Endosafe-PTS (Charles River). Для получения флуоресцентных кристаллов га-

лектина-10, N-концевую His-метку галектина-10, меченного 5-IAF, удаляли путем инкубирования в течение ночи, как описано выше. Эти флуоресцентные кристаллы имели бесчисленное множество форм, первоначально описанных Шарко (фиг. 1E).

Пример 2. Характеризация CLC, выращенных *in vivo*.

В настоящее время отсутствует описание структуры кристаллической решетки CLC, выращенного *in vivo*. Поэтому, кристаллы были выделены из слизистого секрета пациентов с CRSwNP. Ткань слизистой оболочки дыхательных путей и/или секреты брали у пациентов, перенесших эндоскопическую операцию на пазухах по поводу хронического риносинусита с носовыми полипами (CRSwNP) (фиг. 2A). Полипоз носа был диагностирован на основании симптомов, клинического обследования, носовой эндоскопии и компьютерной томографии носовых пазух в соответствии с Европейским протоколом проведения операций по поводу риносинусита и удаления носовых полипов. Все пациенты воздерживались от приема пероральных и/или местных кортикостероидов как минимум за 4 недели до проведения операции. Исследование и сбор образцов были одобрены Комитетом по этике больницы Гентского университета, и до включения в исследование было получено информированное согласие всех пациентов. Слизь "типа муцина, выделяемого из слизистого секрета при аллергии", взятую у пациентов, хранили в течение ночи при 4°C в среде RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium), содержащей антибиотика (50 МЕ/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина Invitrogen), и 0,1% BSA (Sigma).

Для выявления присутствия и идентичности кристаллов CLC было проведено иммунофлуоресцентное окрашивание на галектин-10. Собранный аллергический муцин фиксировали 4% параформальдегидом и заливали в парафин. Срезы ткани (5 мкм) с введенным муцином разрезали, депарафинизировали с использованием ксилола (3 раза по 10 мин) и регидратировали путем ступенчатого погружения в этанол с уменьшающимися концентрациями (100, 90, 60, 30, 0% этанола, 2 мин/шаг). После регидратации, предметные стекла погружали в PBS на 5 мин, а затем инкубировали в течение 1 ч с 0,05% трипсином-ЭДТА (Life Technologies) при 37°C во влажной камере. После промывки PBS (Life Technologies) в течение 10 мин, предметные стекла инкубировали в течение 1 ч с блокирующим буфером (7,5% BSA (Sigma Aldrich) в PBS) во влажной камере при комнатной температуре. Впоследствии, предметные стекла инкубировали в течение ночи при 4°C с антителом против человеческого галектина-10 (клон EPR11197, Abcam, разведение 1/200 в блокирующем буфере). На следующий день, предметные стекла промывали PBS в течение 10 мин и инкубировали с FITC-меченным вторым козым антикроличьим антителом (A11034 Life Technologies, разведение 1/400). После промывки в течение 10 мин в PBS, на предметные стекла устанавливали экран Vectashield, содержащий DAPI. Предметные стекла хранили в темноте и на следующий день анализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа (Leica). Это выявило наличие большого количества игольчатых кристаллов, которые подвергались иммунологической реакции с галектином-10 (фиг. 2B).

Для очистки кристаллов в целях проведения кристаллографии *ex vivo*, среду отбрасывали и 1 г слизи тщательно разрезали в 10 мл среды RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Bornem, Бельгия), содержащей антибиотика (50 МЕ/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина; Invitrogen), 0,1% BSA (Sigma) и 1 мг/мл коллагена типа 2 (Worthington). Затем слизь гомогенизировали с использованием диссоциатора GentleMACS (Mytenyi Biotec), а затем инкубировали при 37°C в течение 45 мин при непрерывном вращении. После инкубирования, частично растворенную слизь гомогенизировали с помощью диссоциатора GentleMACS (Mytenyi Biotec) и центрифугировали при 400×g в течение 7 мин при комнатной температуре. После центрифугирования, супернатант отбрасывали и осадок растворяли в 3 мл PBS (Life technologies), содержащем 50 МЕ/мл пенициллина и 50 мг/мл стрептомицина (Life technologies). 3 мл выделенной жидкости смешивали с 6 мл Фиколла-Пака (GE Healthcare) и центрифугировали при 250×g в течение 10 мин. После удаления супернатанта и большей части слоя фиколла, 2,8 мл PBS с антибиотиками добавляли к оставшейся жидкости (200 мл) на дне пробирки. Этот процесс осаждения повторяли еще 5 раз. Конечную жидкость, содержащую кристаллы на дне пробирки, ресуспендировали в 2 мл PBS с антибиотиками и центрифугировали при 200×g в течение 5 мин. Большую часть супернатанта удалили и к кристаллам в оставшихся 200 мл жидкости на дне пробирки добавили 800 мл PBS с антибиотиками. Монокристаллы собирали из раствора с помощью установленных криосборников (фиг. 2C). Перед мгновенным замораживанием в жидком азоте, кристаллы подвергали криозащите путем кратковременного вымачивания в PBS с добавлением 35% (об./об.) глицерина. Эксперименты по оценке дифракции при 100 K проводили на канале P14 компании Petralli (DESY, Hamburg, Germany). Все данные были объединены и масштабированы с помощью пакета программ XDS (Kabsch, 2010). Молекулярную замену (MR) проводили с помощью Phaser (McCoey et al., 2007) с использованием моделей поиска, основанных на структуре галектина-10 (PDB 1LCL). Создание (повторное создание) модели осуществляли в устройстве COOT (Emsley et al., 2010), и уточнение отдельных координат и ADP осуществляли в PHENIX (Adams et al., 2010) и auto-Buster (Bricogne et al., 2017). Инструменты для подтверждения моделей и карт в COOT и пакет программ PHENIX использовали на протяжении всего рабочего процесса для оценки улучшения и подтверждения качества кристаллографических моделей. С применением этой методики, структура кристалла CLC человека, выделенного у пациента, страдающего полипами носовой полости, была определена с помощью

дифракции рентгеновских лучей на монокристалле с использованием синхротронного излучения (с разрешением 2,2 Å) (фиг. 2D, 2E, табл. 17). Полученную кристаллическую структуру сравнивали со структурой кристаллов рекомбинантного галектина-10 (с разрешением 1,4 Å) и с опубликованной структурой кристаллов галектина-10, полученных посредством лизиса эозинофилов и кристаллизации *in vitro* (pdb 1LCL, 1,8 Å) (Leonidas et al., 1995). Проведенный анализ показал, что все три кристаллические формы галектина-10 принадлежат к спейсерной группе P6<sub>5</sub>22 с аналогичными параметрами элементарной ячейки (табл. 17). Кроме того, атомные структуры для рекомбинантного галектина-10, продуцируемого в *E.coli*, и для галектина-10, полученного из линии эозинофильных клеток человека (pdb 1LCL), можно считать практически идентичными структуре галектина-10 в кристаллах CLC человека (RMSD <0,2 Å) (фиг. 2F).

Пример 3. Продуцирование не-аутокристаллизующегося варианта галектина-10, галектина-10-Тур69Glu.

Для получения не-аутокристаллизующегося варианта галектина-10 были проанализированы взаимодействия упаковки кристаллов (фиг. 3A и фиг. 3B) в описанной структуре галектина-10 (PDB 1LCL). Остаток Тур69, который участвует во взаимодействиях упаковки кристаллов с соседним остатком Тур69 галектина-10 в кристаллической решетке, был выбран в качестве потенциального ключевого остатка для аутокристаллизации (фиг. 3A). В соответствии с этим, вариант галектина-10, несущий замену Тур69Glu (Y69E), был рекомбинантно продуцирован в соответствии с тем же протоколом, идентичным протоколу получения галектина-10 дикого типа. Для получения потенциально не-аутокристаллизующегося варианта галектина-10, остаток Тур69 был заменен остатком глутамата с помощью сайт-направленного мутагенеза Quickchange (Agilent). Для ПЦР-мутагенеза использовали нижеследующие прямой и обратный праймеры FP:

GATGAACTCTCGTGAAGAAGGTGCATGGAAACAG (SEQ ID NO: 154) и RP:

CTGTTTCCATGCACCTTCTTCACGAGAGTTCATC (SEQ ID NO: 155). Плазмиду pET28a-галектин-10 использовали в качестве матрицы. Полученную плазмиду pET28a-галектин-10-Y69E использовали для трансформации клеток BL21 (DE3). Продуцирование и очистка белка были идентичны продуцированию и очистке галектина-10 дикого типа. После TEV-опосредуемого удаления N-концевой метки галектина-10-Y69E, His-меченную TEV удаляли путем пропускания смеси для расщепления на колонке с Ni-сефарозой с использованием PBS в качестве рабочего буфера. Затем проточную фракцию на колонке, содержащую галектин-10-Y69E, концентрировали и вводили в колонку HiLoad 16/600 с 200 µg Superdex. Фракции ЭХ-элюирования, соответствующие галектину-10-Y69E, объединяли и хранили при -80°C. Уровни эндотоксина определяли как рекомбинантный белок с уровнем ЭЕ ниже 5 мг<sup>-1</sup> с использованием системы Endosafe-PTS (Charles River). Было обнаружено, что после TEV-обработки, мутеин галектин-10-Y69E не аутокристаллизовался в отличие от галектина-10 дикого типа (фиг. 3C). В соответствии с аналогичной методикой было получено несколько других мутеинов, устойчивых к кристаллизации, исходя из предсказанной важной роли пограничного слоя упаковки кристаллов (фиг. 3C). Анализ SEC-MALLS также показал, что вариант Y69E представляет собой димер в растворе. Определенная молекулярная масса составляла 32,6 кДа, что почти соответствовало теоретической молекулярной массе для TEV-расщепленного димерного галектина-10-Тур69Glu (33,2 кДа).

Также была получена кристаллическая структура не-аутокристаллизующегося мутеина галектина-10-Y69E. Для этого галектин-10-Y69E концентрировали до 6-7 мг/мл перед проведением экспериментов по кристаллизации. Эксперименты по кристаллизации посредством паровой диффузии с сидячей каплей в масштабе нанолитров проводили при 293 K с использованием робота-кристаллизатора Mosquito (ГТР Labtech) и коммерчески доступных экранов с рассеивающей матрицей (Molecular Dimensions, Hampton Research). Кристаллы мутантного мутеина галектина-10-Y69E появлялись через 24 ч в условиях D12 на экране PEG/Ion (Hampton Research - 0,2 M цитрат аммония, pH 5,1, 20% PEG3350) Перед мгновенным замораживанием в жидком азоте, кристаллы галектина-10-Y69E подвергали криозащите путем кратковременного вымачивания кристаллов в маточной жидкости с добавлением 25% ПЭГ 400.

Анализ галектина-10-Тур69Glu с помощью рентгеновской кристаллографии показал, что не-аутокристаллизующийся вариант имеет структуру, фактически идентичную структуре кристаллографического димера галектина-10 в pdb 1LCL (RMSD <0,3 Å) (фиг. 3D и F, табл. 17).

Структура растворимого мутеина в растворе также была изучена с помощью малоуглового рассеяния рентгеновских лучей в растворе (SAXS). Для этого, данные SAXS были оценены на линии луча SWING на синхротроне SOLEIL (Gif-sur-Yvette, France). 50 мкл галектина-10-Тур69Glu вводили на колонку 4,6×300 мм Agilent Bio для ЭХ-3 с размером пор 300 Å и HBS, pH 7,4, в качестве рабочего буфера при скорости потока 0,3 мл/мин при 15°C. Данные по рассеянию рентгеновских лучей собирали в режиме непрерывного потока с временем экспозиции 1 сек. на кадр. Данные были зарегистрированы в диапазоне передачи импульса 0,0066 Å<sup>-1</sup><q<0,609 Å<sup>-1</sup>, с q=4πsinθ/λ. Исходные данные усредняли по радиусу и вычитали данные для буфера с использованием программы Foxtrot v3.3.4 (разработанной в Synchrotron SOLEIL и предоставленной Xenocs, Sassenage, France). Качество данных анализировали с помощью Foxtrot, путем оценки стабильности радиуса вращения по длине пика элюирования и масштабирования всех

кривых по наиболее интенсивному профилю рассеяния. Окончательная кривая рассеяния была получена путем усреднения немасштабированных профилей рассеяния за вычетом буфера из кадров 255-268, которые соответствуют вершине пика элюирования. Структурные параметры определяли с помощью пакета программ ATSAS версии 2.8.3 (Franke et al., 2017). Вычисление молекулярной массы осуществляли методами DATMW исходя из объема пор (Petoukhov et al., 2012), объема корреляции (Rambo et al., 2013) и кажущегося объема (Fischer et al., 2010). Теоретический профиль SAXS для димерного галектина-10-Тур69Glu был вычислен на основе определенной рентгеновской структуры и подогнан к экспериментальным данным с использованием сервера FoXS (Schneidman-Duhovny et al., 2016). График остаточной разницы со взвешенной вероятностью ошибок вычисляли по формуле  $\Delta/\sigma = [I_{exp}(q) - cI_{mod}(q)]/\sigma(q)$  в зависимости от  $q$  (Trewthella et al., 2017). Анализ SAXS показал, что димерная сборка, полученная с помощью рентгеновской кристаллографии, соответствует структуре в растворе (фиг. 3Е).

Пример 4. CLC индуцирует врожденный иммунный ответ *in vivo*.

Для того чтобы выяснить, вызывают ли кристаллы галектина-10 воспаление легких *in vivo*, "необученным" мышам C57Bl/6 (Janvier) вводили интратрахеальную инъекцию кристаллического галектина-10 или контрольного растворимого мутеина галектина-10-Тур69Glu. Для этого, мышей анестезировали изофлураном (2 л/мин, 2-3%; 05260-05, Abbott Laboratories), а затем интратрахеально (it) вводили 100 мкг кристаллов галектина-10 или контрольный растворимый мутеин галектина-10-Тур69Glu (в 80 мл PBS). Через 6 ч и 24 ч, мышей умерщвляли путем CO<sub>2</sub>-ингаляции и извлекали легкие. Для получения моноклеточных суспензий, легкие сначала разрезали ножницами, а затем гидролизовали при 37°C в течение 30 мин в среде RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific), содержащей Либеразу™ (1:50; 05 401127 001, Sigma-Aldrich) и ДНКазу I (1:1000; 04 536 282001, Sigma-Aldrich). Полученную суспензию фильтровали через 70 мкм-фильтр и очищали от эритроцитов буфером для лизиса эритроцитов (0,15 М NH<sub>4</sub>Cl, 1 мМ KHCO<sub>3</sub>, 0,1 мМ Na<sub>2</sub> EDTA в H<sub>2</sub>O MilliQ). Моноклеточные суспензии окрашивали для проведения проточной цитометрии. Были использованы следующие антитела: анти-CD3ε антитело с FITC (145-2C11) (35-0031-U500, Tonbo Biosciences), анти-CD19 антитело с FITC (1D3) (35-0193-U500, Tonbo Biosciences), анти-CD11 антитело с FITC (HL3) (553801, BD Biosciences), анти-Siglec-F антитело с PE (552126, E50-2440) (BD Biosciences), анти-CD127 антитело с PE-CF594 (SB/199) (562419, BD Biosciences), анти-CD25 антитело с PE-Cy7 (PC61.5) (25-0251-82, ThermoFisher Scientific), анти-CD11b антитело с V450 BD Horizon (M1/70) (560455, BD Biosciences), анти-CD45 антитело с BV605 (30-F11) (563053, BD Biosciences), анти-CD90.2 антитело с APC (52-2.1) (17-0902-82, ThermoFisher Scientific), анти-Ly6G антитело с AF700 (1A8) (561236, BD Biosciences) и анти-CB117 антитело с APC-eFluor780 (2B8) (47-1171-82, ThermoFisher Scientific). Жизнеспособные клетки идентифицировали с использованием красителя eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 506 (ThermoFisher Scientific). Для блокирования неспецифического связывания антител использовали Fc Block 2.4.G2 (1:600, Biotoceros). Маркеры клеточной поверхности окрашивали в течение 30 мин при 4°C в темноте. К каждому образцу добавляли сферы для подсчета 123count eBeads™ (ThermoFisher Scientific). Параметры оценивали с использованием компенсационных сфер UltraComp eBeads™ (ThermoFisher Scientific). Данные были собраны на BD LSRFortessa и проанализированы с помощью программы FlowJo (Tree Star Incorporation).

Через 6 ч наблюдался сильный приток нейтрофилов в дыхательные пути мышей, получавших кристаллы галектина-10, но не получавших растворимый мутеин галектина-10'Y69E или контрольный раствор PBS (фиг. 4А). Через 24 ч наблюдался сильный приток моноцитов в дыхательные пути мышей, получавших кристаллы галектина-10, но не получавших растворимый мутеин галектин-10-Y69E или контрольный раствор PBS (фиг. 4А).

Также было оценено продуцирование провоспалительных цитокинов у мышей, получавших кристаллы галектина-10 (фиг. 4В и С). Также было оценено продуцирование хемокина CCL-2 (фиг. 4С). Мышей умерщвляли путем введения избыточной дозы пентобарбитала, и проводили бронхоальвеолярный лаваж (BAL) путем инъекции 1 мл PBS, содержащего 0,01 мМ EDTA. Затем, BAL центрифугировали (400×g, 5 мин, 4°C) и супернатант хранили при -20°C. Также были получены лизаты ткани легких. Для оценки секреции цитокинов использовали набор для ELISA Ready-Set-Go от ThermoFisher Scientific. Половину площади плоскодонного 96-луночного планшета (Greiner) покрывали 50 мкл на лунку антитела для захвата, разведенного в 1× буфере для нанесения покрытий (00-0000-53, ThermoFisher Scientific), и инкубировали в течение ночи при 4°C. Были использованы следующие антитела: антитело для захвата против мышинового IL-1β (1:250; 14-7012-68А); антитело для захвата против мышинового IL-6 (1:250; 14-7061-68); антитело для захвата против мышинового TNFα (1:250; 14-7423-68) в соответствии с инструкциями коммерческого поставщика ThermoFisher Scientific. 50 мкл на лунку образцов, стандарт (стандартный мышинный IL-1β (39-8012-60); стандартный мышинный IL-6 (39-8061-60); стандартный мышинный TNFα (39-8321-60), все от ThermoFisher Scientific), и контроль были добавлены в Duplo. После инкубирования и промывки добавляли 50 мкл на лунку детектирующего антитела (биотинилированного детектирующего антитела против мышинового IL-1β (1:250; 13-7112-68А); биотинилированного детектирующего антитела против мышинового IL-6 (1:250; 13-7062-68А); биотинилированного детектирующего антитела против мышинового TNFα (1:250; 13-7341-68А), все от ThermoFisher Scientific), разбавленных в 1× анали-

тическом разбавителе, с последующим дополнительным инкубированием в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем лунки промывали и добавляли реагент стрептавидин-ПХ (1:250; 00-4100-94, ThermoFisher Scientific), разведенный в аналитическом разбавителе. После инкубирования в течение 30 мин при комнатной температуре, лунки промывали и добавляли раствор субстрата TMB (00-4201-56, ThermoFisher Scientific). Реакцию останавливали добавлением 2,5 н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и оптическую плотность считывали на 450 нм на счетчике Perkin Elmer Multilabel, а затем данные собирали с помощью программного обеспечения Wallac 1420 Manager. Для оценки уровней CCL-2 использовали набор для ELISA на мышный CCL2 (MCP-1) Ready-SET-Go!<sup>TM</sup> от eBioscience в соответствии с инструкциями производителя (номер по каталогу 50-112-5204).

Инъекция кристаллов галектина-10 сопровождалась продуцированием IL-6 и TNF-а через 6 ч после инъекции, тогда как в образцах BAL индуцирования IL-1β не наблюдалось (не показано). Инъекция контрольного растворимого мутеина галектина-10-Y69E или PBS не приводила к продуцированию цитокинов (фиг. 4B).

Инъекция кристаллов галектина-10 также сопровождалась продуцированием больших количеств IL-1β и CCL-2, как было определено в ткани легких (фиг. 4C).

Пример 5. Врожденный иммунный ответ, индуцированный CLC, не зависит от инфламмосомы Nlrp3 *in vivo*.

Многие неорганические и органические кристаллы обладают способностью вызывать секрецию IL-1β из воспалительных клеток посредством запуска инфламмосомы Nlrp3, что приводит к рекрутингу адиптера ASC, к образованию специфического ASC и к активации каспазы 1 для процессинга про-IL-1β (Kool et al., 2011). В статье, недавно опубликованной на сайте BioRxiv (bioRxiv 252957; doi:https://doi.org/10.1101/252957), сообщается, что кристаллы Шарко-Лейдена, выделенные из линии эозинофильных клеток человека, могут запускать инфламмосому NLRP3 *in vitro*. Однако, не сообщалось, зависит ли индуцированное кристаллами воспаление от NLRP3 *in vivo* или нет, что может указывать на то, что инфламмосома является терапевтической мишенью. Воспаление исследовали через 24 ч, как описано в примере 4. Когда кристаллы галектина-10 вводили в дыхательные пути Nlrp3<sup>-/-</sup> или Casp1/11<sup>-/-</sup> мышей, то не наблюдалось снижения индуцированного кристаллами притока клеток в отличие от контрольных мышей из однопородного потомства C57Bl/6 дикого типа (фиг. 5). Следовательно, маловероятно, что ингибирование инфламмосомы будет успешно подавлять воспаление, индуцированное CLC *in vivo*.

Пример 6. Врожденный иммунный ответ, индуцированный CLC, не зависит от Tlr4.

Рекомбинантные кристаллы галектина-10 были получены из белка галектина-10, продуцируемого в *E.coli*, клеточная стенка которой имеет бактериальный эндотоксин. Поскольку эндотоксин может вызывать врожденный иммунный ответ в легких, то было важно проверить потенциальную важность загрязнения кристаллов галектина-10 эндотоксином для индуцирования воспаления дыхательных путей. По этой причине также был изучен иммунный ответ на кристаллы галектина-10 у Tlr4<sup>-/-</sup> мышей, у которых отсутствует рецептор для эндотоксина. Воспаление исследовали как описано в примере 4. У этих мышей не наблюдалось снижения, индуцированного кристаллами нейтрофильного воспаления дыхательных путей через 24 ч после инъекции, в отличие от однопородных мышей C57Bl/6 дикого типа (фиг. 6).

Пример 7. Кристаллы галектина-10 имитируют воспаление дыхательных путей и синтез IqE у гуманизованных мышей, получавших МКПК, взятых у людей с астмой.

Галектин-10 представляет собой неоантиген мышинной иммунной системы, поскольку мыши не несут ген LGALS10, кодирующий галектин-10. Поэтому эксперименты были проведены на гуманизованных мышах, несущих иммунную систему человека-донора, страдающего астмой, вызываемой аллергией на клещей домашней пыли (HDM). Для сбора МКПК, 50 мл крови пациента с аллергией на клещей домашней пыли собирали в пробирки, покрытые EDTA. Кровь разводили в RPMI 1640 (об./об.) и наносили слоями поверх 12 мл фиколла. После центрифугирования (1200×g, 20 мин, при комнатной температуре), МКПК собирали и промывали в PBS. Клетки подсчитывали с использованием трипанового синего для исключения погибших клеток. МКПК ресуспендировали в PBS в концентрации 15×10<sup>6</sup> клеток/мл. В день 0, мышей NOD Rag<sup>-/-</sup> uc<sup>-/-</sup> (NRG) восстанавливали путем внутрибрюшинной инъекции 3×10<sup>6</sup> МКПК. В дни 1-4 и 7-9, всем мышам вводили интратрахеально 20 мкг экстракта HDM (Greer), разведенного в 50 мкл PBS. В экспериментах по изучению провоспалительных эффектов кристаллов галектина-10, на дни 1, 3, 7 и 9, мышей NRG обрабатывали по следующим схемам (фиг. 7A): схема 1, PBS-контроль 30 мкл; схема 2, 100 мкг кристаллов рекомбинантного галектина-10 (1 мкл исходного раствора), разбавленных в 30 мкл PBS; схема 3, 100 мкг рекомбинантного мутеина галектин-10-Tyr69Glu (1 мкл исходного раствора), разбавленного в 30 мкл PBS.

На 27 день, всем мышам в последний раз интратрахеально вводили 20 мкг экстракта HDM (Greer), разведенного в 80 мкл PBS. Всех мышей умерщвляли на 28 день путем внутрибрюшинного введения избыточной дозы пентобарбитала. У мышей брали кровь через подвздошную вену. Кровь собирали в сухие пробирки. Эти пробирки центрифугировали (5000 об/мин в течение 10 мин) для получения сыворотки. Для получения моноклеточных суспензий легких, левое легкое извлекали, измельчали ножницами

для иридэктомии, гомогенизировали в PBS с размером ячейки 100 мкм, промывали путем добавления избытка PBS и центрифугировали при 400×g в течение 7 мин. Гранулы ресуспендировали в PBS и хранили на льду до дальнейшего использования (в проточной цитометрии).

Верхние и нижние доли правого легкого фиксировали в 4% PFA перед заливкой в парафин для гистологии. Среднюю долю правого легкого погружали в OCT и замораживали при -80°C до дальнейшего использования (в кол.ОТ-ПЦР и в иммунофлуоресценции).

Для обнаружения человеческих клеток, моноклеточные суспензии левого легкого мышей инкубировали в течение 20 мин при 4°C с APC-мечеными антителами против человеческого CD45. Погибшие клетки окрашивали с использованием набора, содержащего краситель для фиксируемого окрашивания живых/погибших клеток Aqua (BD). После промывки клеток в PBS, к каждому образцу добавляли 15000 сфер для подсчета. Затем клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на приборе Fortessa (BD). Ни одно из используемых Ab перекрестно не реагировало с мышинными тканями.

Концентрации человеческого IgE измеряли в сыворотке мышей NRG с использованием набора ELISA для человеческого IgE без покрытия (ThermoFischer). Вкратце, планшеты для ELISA покрывали в течение ночи при 4 градусах антителами против человеческого IgE в буфере для покрытия. После промывки избытком PBS-0,05% Твина 20, планшеты для ELISA блокировали в течение 2 ч при комнатной температуре блокирующим буфером, предоставленным производителем. После промывки, в планшеты добавляли стандартные IgE (серийное разведение 1:2), а также сыворотку мышей NRG (разведение 1:5 в блокирующем буфере) и инкубировали в течение 2 ч. Детектирующее антитело добавляли в течение 1 ч при комнатной температуре. Присутствие человеческого IgE выявляли путем добавления субстрата TMB во все лунки. Планшеты считывали при 450 нм на спектрофотометре.

Через 28 дней, степень притока человеческих CD45<sup>+</sup>-клеток в дыхательные пути (фиг. 7B) и синтез человеческого IgE (фиг. 7C) были значительно выше у мышей, получавших 4 инъекции кристаллического галектина-10, по сравнению с мышами, получавшими мутеин галектин-10-Тут69Glu, или мышами, получавшими PBS во время периода заражения НДМ, что указывало на то, что кристаллы галектина-10 усиливают приток человеческих клеток в легкие и синтез IgE у иммунодефицитных мышей с моделью астмы, восстановленных с помощью иммунной системы донора с аллергией на НДМ.

Пример 8. Получение антител к галектину-10.

А. Иммунизация лам.

Двух лам (*Lama glama*), названных Ynigo и Montoyo, внутримышечно иммунизировали белком, а именно, кристаллами галектина-10 (1 мг/дозу на ламу).

Иммунизацию белком начинали в день 0, и кристаллы галектина-10 вводили через каждые 14 дней, всего три инъекции (всего пять недель). Через пять дней после последней иммунизации, у иммунизированных лам было взято 400 мл крови для выделения МКПК и экстракции РНК.

Для определения иммунного ответа у двух иммунизированных лам использовали набор для твердо-фазного иммуноферментного анализа (ELISA). Для ELISA использовали гомогенную некристаллизованную форму галектина-10.

Для проведения ELISA, планшет Maxisorp покрывали галектином-10 (100 пг/мл) и блокировали казеином. В лунки планшета добавляли серийные разведения сыворотки лампы до и после иммунизации. Затем IgG1 лампы, связанные с покрытым галектином-10, детектировали мышинным антителом против СН1 лампы (10D12), и детектирование осуществляли с помощью ПХ-конъюгированного антитела против мышинных IgG (DAMPO). И наконец, после добавления TMB, реакцию останавливали с помощью 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и измеряли оптическую плотность на 450 нм (Tecan Sunrise, программа Magellan). Обе иммунизированные лампы показали сильный иммунный ответ против галектина-10, хотя было введено всего 3 инъекции.

В. Конструирование библиотеки (scFv).

Библиотеки scFv были сконструированы следующим образом. мРНК выделяли из МКПК, взятых из крови иммунизированных лам. мРНК подвергали обратной транскрипции с помощью рандомизированных гексамерных праймеров для получения кДНК. Для конструирования библиотек тяжелых и легких цепей была проведена двухстадийная ПЦР. Сначала использовали немеченые праймеры непосредственно на кДНК для амплификации областей VH-CH1, VL-CL и Vk-Ck. Затем ПЦР-продукт очищали и использовали во второй ПЦР с мечеными праймерами scFv для амплификации VH, VL и Vk, и их клонировали отдельно в фагмидном векторе для создания библиотек scFv лам "лямбда" и "каппа" соответственно. Гибридный белок scFv состоял из последовательностей VH и VL, связанных линкером (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> (из остатков глицина и серина) размером приблизительно 25 кДа. Выбор библиотек scFv был основан на том факте, что фрагменты scFv лучше экспрессируются в виде гибридных белков III на конце фага, чем Fab. Это давало лучший выход и большее разнообразие фаговых библиотек во время отбора фагового представления. Однако, фрагменты scFv имеют тенденцию образовывать агрегаты, что может очевидно приводить к более высокой аффинности из-за эффекта авидности. Фрагменты антител в формате scFv могут секретироваться в периплазматическое пространство бактерий *E.coli* посредством IPTG-индуцирования.

Обогащение фага, экспрессирующего специфические фрагменты scFv к галектину-10, проводили с помощью трех раундов отбора на иммобилизованном галектине-10.

Первоначальный отбор подходящих клонов scFv, специфичных для галектина-10, был проведен методом биопэннинга. Вкратце, галектин-10-HIS был иммобилизован на планшетах Maxisorp для ELISA, затем была добавлена библиотека фагов scFv (исходная). Несвязанные фаги удаляли путем проведения множества стадий промывки. И наконец, связанные фаги были элюированы трипсином, и было проведено инфицирование бактерией *E.coli* для амплификации выбранных фагов. Этот процесс приводил к обогащению популяции фагов, экспрессирующих scFv, высокоаффинным антителом к галектину-10. По окончании раунда отбора, количество элюированных фагов оценивали путем титрования *E.coli*-инфицированных пятен (от  $10^{-1}$  до  $10^{-6}$ ) на чашках Петри, содержащих твердую среду LB с ампициллином и глюкозой. Первый раунд отбора библиотеки лямбда и каппа от обеих лам приводил к незначительному обогащению специфических фагов против галектина-10. Эти второй и третий раунды отбора приводили к обогащению фагов, экспрессирующих scFv и имеющих, вероятно, более высокую аффинность к галектину-10.

После проведения раунда 2 (библиотека каппа и лямбда против 5 мкг/мл галектина-10) и раунда 3 (библиотека каппа против 0,2 мкг/мл и библиотека лямбда против 0,02 мкг/мл) были созданы отдельные клоны, в результате чего было приготовлено шесть планшетов Master. Из этих планшетов Master были изготовлены периплазматические планшеты Master (PMP). Для этой цели, отдельные клоны из планшетов Master сначала амплифицировали в 96-луночном формате (с глубокими лунками), и продуцирование scFv индуцировали путем инкубирования в течение ночи с IPTG. На следующий день, бактерии лизировали путем проведения двух циклов замораживания/оттаивания (-80 и -20°C). После центрифугирования, супернатант (периплазматический экстракт) собирали и переносили в отдельный 96-луночный планшет для тестирования на способность к связыванию (ELISA и Biacore).

#### C. Скрининг периплазматических экстрактов scFv с помощью ELISA.

Для тестирования способности scFv связываться с галектином-10 был проведен ELISA-анализ на связывание. Вкратце, планшет maxisorp покрывали растворимым галектином-10 (1 мкг/мл), а затем блокировали казеином перед инкубированием с периплазматическим экстрактом (разведение 1/5 в PBS), содержащим scFv-Мус. Детектирование связывания проводили с использованием ПХ-конъюгированного антитела против Мус. Оптическую плотность измеряли на 450 нм (эталон на 620 нм) с помощью прибора Тесла. Значительное количество scFv, связывающегося с галектином-10, было выделено после второго раунда отбора (45-87% связывания). Для обеих L-аминокислот, библиотека лямбда показала больший уровень связывания с галектином-10, чем библиотека каппа. Третий раунд отбора приводил к увеличению числа клонов scFv с высокой способностью связывания с галектином-10. Клоны scFv, продуцируемые из библиотеки лямбда, обнаруживали 74-93% связывание с галектином-10, тогда как scFv, продуцируемые из библиотеки каппа, обнаруживали 15-20% связывание.

#### D. Секвенирование и трансформация клонов scFv.

Отобранные клоны scFv, которые показали связывание с галектином-10, секвенировали. На основании их последовательностей CDR1-2-3, VH и VL, каждый клон был классифицирован как принадлежащий к определенному семейству. Этот процесс позволил определить 65 семейств VH, 13 семейств VKappa и 23 семейств VLambda. Двенадцать клонов, показанных ниже в табл. 3, были отобраны для дальнейшей характеристики.

Связывание клонов scFv с галектином-10

Название клона	Выделенные после раунда отбора	Концентрация Gal10 во время отбора (мкг/мл)	Связыва ние PERI- ELISA (величины OD)	Число семейств в VH	Число семейств лямбда	Число семейств каппа
1A12	2	5	2,134	32	4	
2B11	2	0,5	3,793	57	1	
2C07	2	0,5	3,626	7	1	
2E11	2	0,5	3,511	23	23	
3A03	3	0,2	3,4	65		2
4B10	3	0,02	2,435	17	4	
4G05	3	0,2	3,803	18	4	
4H10	3	0,02	3,484	59	17	
5012	3	0,02	2,415	64		3
6A11	3	0,02	2,346	24	23	
6F05	3	0,2	3,827	26	17	
6F011	3	0,02	3,757	53	23	

Последовательности CDR, VH и VL этих клонов показаны ниже в табл. 14, 15 и 16.

12 клонов scFv в табл. 3 были повторно клонированы как гибридные молекулы scFv-человеческий Fc. Для этой цели, ДНК каждого выбранного клона scFv сначала гидролизировали рестриктирующими ферментами (Acl/Sfi). После экстракции ДНК из агарозного геля, ДНК лигировали в предварительно гидролизованный вектор, содержащий константные домены CH2-CH3 человеческого IgG1 (вектор для слияния rUPEX50:pScFv-Fc). Трансформацию каждого лигированного продукта осуществляли с использованием бактерий Top10 под действием теплового шока и переносили на планшеты с LB-агарозой и с ампициллином. После одного инкубирования в течение одной ночи, лигированные продукты показали большое число бактериальных моноколоний, тогда как колонии для негативного контроля (пустые векторы) не обнаруживались. Для каждого клона scFv было отобрано от четырех до восьми колоний, которые затем отправляли для секвенирования. Клоны, которые обнаруживали правильную вставку (VH/VL), отбирали и амплифицировали для очистки последовательности ДНК (MidiPrep). Затем было инициировано продуцирование в клетках млекопитающих. Каждую ДНК клона scFv-человеческого Fc переносили в клетки HEK293E посредством полиэтиленimina (PEI). Через 6 дней, молекулы scFv-человеческого Fc очищали из клеточного супернатанта с использованием сфер с белком А-сефарозой. И наконец, был проведен анализ с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ для оценки чистоты и целостности молекул scFv-человеческого Fc (~ 100 кДа).

Е. Характеризация панели scFv-человеческого Fc.

Были проведены ELISA и SPR на устройстве Biacore T3000 для оценки связывающих свойств панели scFv-человеческого Fc.

(i) ELISA-анализ

В эксперименте, аналогичном эксперименту, который проводили во время первоначального скрининга, относительные свойства связывания 12 клонов scFv-человеческого Fc анализировали с помощью ELISA. Вкратце, планшет maxisorp покрывали галектином-10-His в концентрации 0,2 мкг/мл и блокировали казеином перед инкубированием с серийным разведением гибридных молекул scFv-человеческого Fc. После нескольких стадий промывки, детектирование связанного scFv-человеческого Fc проводили с использованием ПХ-конъюгированного антитела против человеческого Fc. Поглощение измеряли на 450 нм (эталон на 620 нм) с помощью прибора Тесап. И наконец, необработанные данные (значения OD) были отложены на графике GraphPad Prism 7.01. Значения EC50 для каждого соединения рассчитывали с помощью нелинейной регрессии (log(агонист) по наклону кривой результирующих переменных, (четыре параметра)). Результаты показаны ниже в табл. 4.

Таблица 4

ELISA на связывающие свойства основной панели антител scFv-человеческого Fc

Названия клона (ScFv-hFc)	R <sub>max</sub> (величины OD)	EC50 (нМ)
1A12	0,409	неоднозначные
2B11	2,432	0,08
2C07	2,887	0,05
2E11	1,425	0,14
3A03	1,81	0,06
4B10	1,28	0,08
4G05	3,034	0,09
4H10	1,301	0,2
5E12	1,84	0,25
6A11	1,595	0,01
6F05	2,895	0,02
6F11	1,565	0,48
Контрольный изотип	0,018	/

Клоны 2C07, 6F05, 4G05 и 2B11 показали лучшую относительную связывающую способность со значениями EC50 0,02-0,09 нМ.

Клоны 6F11 и 5E12 показали самую низкую связывающую способность (значения EC50 0,25-0,48 нМ).

Один клон (1 A12) показал слабое связывание с галектином-10 с неоднозначным соответствием.

Кроме того, вся панель показала сходную способность связываться с покрытым галектином-10 и с His-меченным галектином-10.

(ii) Анализ с помощью ППР.

Для определения связывающих свойств (ассоциации/диссоциации) панели scFv-человеческого Fc была проанализирована способность их связывания с галектином-10 на Biacore T3000. Для этой цели был разработан метод захвата. Чип CM5 покрывали поликлональным антителом против человеческого Fc при 8000 RU, а затем фиксированную концентрацию панели scFv-человеческого Fc (1,5 мкг/мл), разведенную в HBS-EP, pH 7,4, захватывали для достижения сигнала связывания приблизительно 150 RU. И наконец, вводили серийное разведение галектина-10-His (серийное разведение, 1/2 из 5 мкг/мл, 6 точек разведения), разведенного в HBS-EP, pH 7,4. Необработанные данные анализировали с помощью компьютерной программы для оценки ВИА с вычитанием фона (4-3). K<sub>d</sub>/K<sub>D</sub> и R<sub>max</sub> каждого scFv-человеческого Fc для галектина-10-His определяли по формуле кинетики одновременного связывания при ka/kd/связывания с переносом массы/локальный R<sub>max</sub> с помощью компьютерной программы для оценки ВИА. Результаты представлены ниже в табл. 5.

Таблица 5

Характеризация связывающих свойств панели антител scFv-человеческого Fc на Biacore T3000

Название клона (ScFv-hFc)	Rmax	kd 1E-04 (1/c)	KD (нМ)
1A12	12,4	31,5	11,7
2B11	37,3	180	0,875
2C07	41,3	2,59	0,677
2E11	21,6	111	1,16
3A03	18,3	111	1,56
4B10	20,6	128	1,94
4G05	23,6	437	0,911
4H10	19,6	27,7	1,55
5E12	6,67	17,7	4,73
6A11	35,6	1240	0,711
6F05	38	1,17	0,918
6F11	28,84	172	2,96
Контрольный изотип	6,06	/	/

Клоны 6F05 и 2C07 явно продемонстрировали наилучшую аффинность (0,9 и 0,6 нМ, соответственно) со скоростью диссоциации  $1,17E-04$  и  $2,59 E-04 c^{-1}$ , соответственно.

Однако другие 10 клонов показали быструю диссоциацию с аффинностями в наномолярном диапазоне ( $>17$  нМ).

F. Скрининг клонов scFv с применением технологии биослойной интерферометрии (BLI) (Octet).

В дополнение к секвенированию и характеристике клонов, описанных выше в разделах D и E, было отобрано 272 клон scFv из планшетов Master 1-6, которые показали четкое связывание в ELISA (скрининг), и их способность связывания с галектином-10-His была проанализирована на BLI с использованием Octet RED96. BLI представляет собой технологию без меток для оценки биомолекулярных взаимодействий. Эта технология представляет собой оптический аналитический метод, который позволяет анализировать интерференционную картину белого света, отраженного от двух поверхностей: слоя иммобилизованного белка на кончике биосенсора и внутреннего эталонного слоя. Любое изменение количества молекул, связанных с кончиком биосенсора, вызывает сдвиг в интерференционной картине, которую можно измерить в реальном времени.

Вкратце, меченный галектин-10-His, разведенный в кинетическом буфере, захватывали кончиками датчика с антителом против Penta His 1K до тех пор, пока не был достигнут уровень иммобилизации 1 нм. Затем наносили разведенные периплазматические экстракты (1/10) и измеряли ассоциацию/диссоциацию с иммобилизованным галектином-10-His с использованием программы для анализа данных ForteBio 9.0 (с вычитанием контрольных Tips, модель связывания 1.1). Во время скрининга можно определить только диссоциацию (скорость диссоциации) scFv, поскольку эффективная концентрация scFv неизвестна и может сильно варьироваться от клона к клону. Результаты подтвердили, что большинство выбранных клонов в панели scFv показали быструю диссоциацию. Однако, некоторые клоны, главным образом, из библиотеки лямбда (2-й и 3-й раунды отбора), показали низкую скорость диссоциации захваченного галектина-10. Следовательно, с учетом данных ELISA и BLI была отобрана новая панель основных scFv.

На основании данных ELISA и данных BLI, для дальнейшей характеристики была выбрана вторая панель основных клонов scFv. Характеристики этих клонов scFv представлены ниже в таблице.

Таблица 6

Вторая панель основных клонов scFv

Название клона	Выделенные после раунда отбора	Концентрация галектина-10, используемого для отбора	ELISA-связывание (величины OD)	BLI-связывание (диссоциация kdis(1/c))	Семейств во VH	Семейств во лямбда
1C08	2	5	3,7	$8,2E-03$	59	17

1C09	2	5	3,5	1,4E-03	58	4
1D011	2	5	3,3	5,2E-03	62	17
2C07	2	0,5	3,6	6,7E-03	7	1
2F09	2	0,5	3,6	9,9E-03	57	23
4E08	3	0,2	3,6	9,4E-03	56	1
6A08	3	0,02	3,5	8,2E-03	26	14
6B06	3	0,2	3,7	5,8E-03	53	23
6E10	3	0,02	3,7	1,6E-02	35	23
6F06	3	0,2	3,8	5,7E-03	14	1

Последовательности CDR, VH и VL этих клонов scFv показаны ниже в табл. 14-16.

G. Трансформация выбранных клонов scFv в остов мышинового IgG1.

Выбранные основные клоны, представленные выше в табл. 6, были повторно клонированы в остов мышинового IgG1 для дальнейшей характеристики. Для этой цели VH и VL каждого клона амплифицировали с помощью ПЦР с использованием специфических праймеров, выделяли путем электрофореза, очищали и расщепляли рестриктирующими ферментами (BsmBI). После расщепления и очистки проводили лигирование ДНК (VH или VL) в предварительно расщепленными векторами BsmBI, содержащими константные домены мышинной легкой цепи лямбда (pUPEX116.35) или тяжелой цепи мышинового IgG1 (CH1-CH2-CH3, pUPEX116.33). Трансформацию каждого лигированного продукта проводили с использованием бактерий Top10 посредством теплового шока и переноса на планшеты с агарозой и ампициллином (ген резистентности векторов). После инкубирования в течение одной ночи, лигированные продукты показали большое количество бактериальных моноколоний, тогда как колонии для негативного контроля (пустые векторы) не наблюдались. На один клон (HC и LC) было собрано от четырех до восьми колоний, которые затем отправляли для секвенирования. Клоны, показавшие правильную вставку, были отобраны и амплифицированы для очистки последовательности ДНК (MidiPrep).

Получение 10 мышинных IgG1 осуществляли путем трансфекции в отношении 1 тяжелая цепь к 3 легким цепям, включенным в клетки HEK293E посредством полиэтиленimina (PEI). Через 6 дней мышинные моноклональные антитела очищали из клеточного супернатанта с использованием сфер с белком А-сефарозой. И наконец, был проведен анализ с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ для оценки чистоты и целостности антител (150 кДа).

H. Характеризация связывающих свойств панели мышинных IgG1 к галектину-10.

Было проведено несколько анализов для оценки связывания и функциональных свойств панели мышинных IgG1 к галектину-10. И для определения связывающей способности основной панели проводили ELISA и ППП на T3000 Biacore.

(i) ELISA-анализ.

В эксперименте, аналогичном эксперименту, который проводили во время характеристики молекул scFv-человеческого Fc, относительные аффинности связывания 10 мышинных антител IgG1 анализировали с помощью ELISA. Планшет maxisorp покрывали в течение ночи 0,2 мкг/мл галектина-10-His. Затем серийное разведение каждого клона (от 100 нМ, разведение 1/4, 12 точек разведения) инкубировали на покрытом галектине-10. После проведения нескольких стадий промывки, детектирование связанного мышинового IgG1 проводили с использованием ПХ-конъюгированного антитела против мышинового Fc. Поглощение измеряли на 450 нм (эталон на 620 нм) с помощью прибора Tecan. В качестве негативного контроля использовали мышинный IgG1 контрольного изотипа. В качестве позитивного контроля для покрытия галектина-10 использовали поликлональное антитело против галектина-10. Необработанные данные (значения OD) были отложены на графике GraphPad Prism 7.01. Значения EC50 для каждого антитела вычисляли с помощью нелинейной регрессии (log(агонист) по наклону кривой результирующих переменных, (четыре параметра)), и эти величины представлены ниже в таблице.

Новая панель мышинных антител IgG1 к галектину-10 показала относительную способность связываться с покрытым галектином-10 от 3,22 до 0,04 нМ. Клоны 2F09, 6A05, 6B06 и 2C07 показали наилучшую относительную аффинность связывания (0,05-0,08 нМ).

Таблица 7

Характеризация связывающих свойств панели мышинных IgG1 с помощью ELISA

Конструкции (мышинный IgG1)	$R_{max}$	$EC50$ (нМ)
1C09	2,297	0,13
1D011	1,498	0,1
2C07	2,947	0,08
2F09	3,293	0,05
4E08	2,063	3,22
6A05	1,744	0,07
6A08	3,196	0,15
6B06	3,278	0,08
6E10	2,398	0,17
6F06	2,926	0,08
Контрольный изотип	0,042	/

(ii) Анализ с помощью ППР.

Связывающую способность мышинных антител IgG1 к галектину-10 анализировали на Biacore T3000. Для этой цели был разработан метод захвата. Чип CM5 покрывали поликлональным антителом против мышинового Fc при 8000 RU, а затем фиксированную концентрацию панели мышинных антител IgG1 (1,5 мкг/мл), разведенную в HBS-EP, pH 7,4, захватывали для достижения сигнала связывания приблизительно 150 RU. И наконец, вводили серийное разведение галектина-10-His (серийное разведение, 1/2 из 5 мкг/мл), разведенного в HBS-EP, pH 7,4. Необработанные данные анализировали с помощью компьютерной программы для оценки ВИА с вычитанием фона (4-3).  $K_d/KD$  и  $R_{max}$  каждого mAb к галектину-10-His определяли по кривой зависимости кинетики одновременного связывания при  $ka/kd$ /связывания с переносом массы/локального  $R_{max}$  с помощью компьютерной программы для оценки ВИА.

Таблица 8

Характеризация связывающих свойств панели мышинных IgG1 с помощью Biacore T3000

Конструкции (мышинный IgG1)	$KD$ (нМ)	$kd$ $1E-04$ (1/с)
1C09	0,5	52,9
1D11	1	52,9
2C07	0,5	3,6
2F09	0,3	3,4
4E08	0,8	8,5
6A05	0,6	48,3
6A08	1	6,7
6B06	0,3	30,6
6E10	0,5	8,2
6F06	0,7	48,7

В этом эксперименте, 10 клонов показали аффинность от наномолярного до субнаномолярного диапазона со скоростью диссоциации от 3,4 до  $53^{1E-04}$  (1/с). В соответствии с данными связывания ELISA, клоны 2F09 и 2C07 были обнаружены в верхней части панели. Скорость диссоциации, измеренная во время характеризации мышинной панели, не соответствовала скорости диссоциации, измеренной во время скрининга. Это в основном объясняется различиями в методах анализа, применяемых во время скрининга (BLI, галектин-10-His, захватываемый наконечниками датчика с антителом против His) и характеризации (НИР, мышинный IgG1, захваченный на чипе с поликлональным антителом против мышинового Fc).

I. Картирование эпитопа для панели мыших IgG1 к галектину-10.

Для идентификации сайтов связывания различных клонов с галектином-10 был разработан метод картирования эпитопа (TANDEM) с применением технологии BLI. Вкратце, галектин-10-His был захвачен кончиками датчиков с антителом против HIS 1K перед инкубированием с избытком одного антитела (называемого "насыщающим" антителом), а затем непосредственно перенесен в раствор, содержащий

"конкурирующее" антитело в субоптимальной концентрации. Если "насыщающее" и конкурирующее антитело связываются с одними и теми же сайтами связывания, то связывание "конкурента" не будет обнаружено (данные выражены сдвигом в нм). Если они не имеют общего эпитопа, то "конкурирующее" антитело может связываться в присутствии "насыщающего" антитела. Контрольный изотип использовали в качестве негативного контроля для "насыщающего" антитела, где все клоны, используемые в качестве "конкурирующих" антител, показали четкое связывание с галектином-10.

Таблица 9

Картирование эпитопа с помощью анализа на конкурентное связывание

Антитело 1 (Насыщающее Ab) (10 мкг/мл)	Антитело 2 (конкурирующее) при 1 мкг/мл (сигнал связывания в нм)										
	1C09	1D01 1	2F09	4E08	6A05	2C07	6A08	6B06	6E01 0	6F06	Буфе р
1C09	0,03	0,01	0,04	-0,02	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03	0,00	-0,02
1D011	0,10	0,06	0,12	0,03	0,04	0,04	0,05	0,07	0,10	0,06	0,02
2F09	0,02	0,02	0,03	0,01	0,01	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
4E08	0,08	0,00	0,10	-0,08	-0,03	-0,05	-0,05	0,03	0,10	0,02	0,01
6A05	0,09	0,06	0,12	0,03	0,05	0,04	0,05	0,06	0,09	0,05	0,01
6A08	0,04	0,01	0,07	-0,03	0,00	-0,01	-0,04	0,02	0,04	0,00	0,01
6E010	0,02	-0,01	0,03	-0,05	-0,03	-0,04	-0,05	-0,02	0,00	-0,03	-0,21
2C07	0,03	0,02	0,05	0,00	0,01	0,03	0,05	0,04	0,06	0,03	0,02
6B06	0,02	0,00	0,03	0,00	0,00	0,04	0,05	0,03	0,04	0,03	0,03
6F06	0,04	0,03	0,06	0,01	0,02	0,04	0,05	0,05	0,07	0,04	-0,05
Изотип	1,21	1,18	1,14	0,97	1,02	0,73	1,04	0,94	1,34	1,15	-0,05
Буфер	/	/	/	/	/	0,80	1,08	0,98	1,38	1,22	/

Результаты показали, что 10 протестированных клонов конкурируют друг с другом, что позволяет предположить, что они связываются с одним и тем же сайтом связывания/эпитопом на галектине-10-His.

Аналогичный подход был применен для первой панели гибрида scFv-человеческий Fc. Все они связывались с одним и тем же эпитопом на галектине-10 (данные не показаны), то есть, с таким же эпитопом, как и эпитоп для mIgG1 против галектина-10.

Пример 9. Характеризация антител к галектину-10 на способность влиять на кристаллизацию *in vitro*.

Было протестировано влияние основных молекул scFv-человеческого Fc к галектину-10 и основных мышинных антител IgG к галектину-10 на образование рекомбинантных CLC, описанных в примере 1. Поскольку аутокристаллизация галектина-10 хорошо воспроизводима *in vitro*, то был использован робот-кристаллизатор Mosquito (ГТР Labtech) для скрининга антител против галектина-10 на их способность блокировать аутокристаллизацию галектина-10. С применением этого подхода были скринированы клоны, которые ингибировали кристаллизацию галектина-10. Для анализа ингибирования кристаллов, растворимый TEV-расщепленный рекомбинантный галектин-10 дикого типа в PBS уравнивали раствором 50% ПЭГ 3350 в течение ночи в присутствии антител против галектина или нерелевантного антитела. Для оценки ингибирования образования кристаллов, 250 нл растворимого TEV-расщепленного рекомбинантного галектина-10 дикого типа в PBS в концентрации 0,4-0,7 мг/мл смешивали со 100 нл антитела против галектина-10 или нерелевантного антитела. Затем, белковую смесь уравнивали 40 микролитрами 50% (об./об.) ПЭГ 3350, содержащегося в лунках 96-луночного планшета для кристаллизации. Из-за действия ПЭГ, количество воды в капле уменьшалось, и следовательно, концентрация галектина-10 повышалась до тех пор, пока не достигалось пороговое значение, при котором галектин-10 кристаллизовался с образованием CLC. После инкубирования в течение ночи, наличие или отсутствие кристаллов CLC оценивали на стереомикроскопе. Присутствие кристаллов определяли как образование кристаллов на 100%, небольшое количество наблюдаемых кристаллов соответствовало образованию кристаллов на 50%, а отсутствие кристаллов, наблюдаемое после инкубирования, было определено как образование кристаллов 0%. Этот эксперимент не был качественным и был направлен только на оценку эффективности различных клонов галектина-10 для блокирования образования CLC. В соответствии с протоколом эксперимента и необходимой высокой концентрации молекул антител против галектина-10 были протестированы только клоны, выбранные из панели scFv-человеческого Fc и мышинового IgG1 против галекти-

на-10.

Кристаллы CLC постоянно появлялись в контрольных условиях, но отсутствовали в условиях, содержащих антитела против галектина-10. Этот экспериментальный протокол проиллюстрирован на фиг. 8А, а эффективность нескольких клонов систематизирована на фиг. 8В.

Результаты показали, что все протестированные клоны (всего 17) были способны блокировать образование CLC. Среди панелей scFv-человеческого Fc, клоны 4B10, 2E11 и 6F5 показали лучшую эффективность в блокировании появления CLC. Клон 1D11 показал лучшую способность блокировать образование CLC среди панелей мышиных IgG1. Клон 6A05 не показал образования CLC даже при самом низком соотношении галектин-10/мышиный IgG1 против галектина-10, и причина этого неясна. Однако, все негативные контроли (галектин-10, инкубированный с нерелевантным scFv-человеческим Fc или мышиным IgG1, буфером или BSA (2 мг/мл)) показали 100% образование CLC после 2-дневного инкубирования.

Пример 10. Антитела к галектину-10 могут солиubilизировать уже существующие CLC in vitro.

С применением аналогичного экспериментального протокола, опосредованную антителами солиubilизацию уже сформированных кристаллов рекомбинантного галектина-10 оценивали с использованием основных молекул scFv-человеческого Fc к галектину-10 и основных мышиных антител IgG к галектину-10. В этом анализе, антитела добавляли к кристаллам, которые образовались после уравнивания в течение ночи раствором ПЭГ3350 (250 нл растворимого TEV-расщепленного рекомбинантного галектина-10 дикого типа в PBS с 50% ПЭГ3350 в течение ночи). Солиubilизация кристаллов наблюдалась в зависимости от времени после добавления антител. Затем добавляли 100 нл антитела против галектина-10 или контрольного антитела и наблюдали солиubilизацию кристаллов галектина-10 под стереомикроскопом. Каждое условие выполнялось в 12 повторностях. В качестве негативного контроля были включены нерелевантные scFv-человеческий Fc и мышиный IgG1, а также только буфер.

В табл. 10 показано, что большинство протестированных клонов антитела против галектина-10 были способны растворять уже имеющиеся CLC. Это растворение происходило менее чем через 2 ч после инкубирования с молекулами антитела против галектина-10.

Таблица 10

Название клона	Формат	100% солиubilизация CLC (конц. мкМ)	Название клона	Формат	100% солиubilизация CLC (конц. мкМ)
1A12	ScFv-человеческий Fc	Не тестировали	1C09	мышиный IgG1	10,48
2B11	ScFv- человеческий Fc	5,04	1D11	мышиный IgG1	7,86
2C07	ScFv- человеческий Fc	6,86	2C07	мышиный IgG1	>2,2
2E11	ScFv- человеческий Fc	4,36	2F09	мышиный IgG1	10,67
3A03	ScFv- человеческий Fc	n.t	4E08	мышиный IgG1	>10
4B10	ScFv- человеческий Fc	6,14	6A05	мышиный IgG1	10,1
4G05	ScFv- человеческий Fc	4,36	6A08	мышиный IgG1	>10
4H10	ScFv- человеческий Fc	6	6B06	мышиный IgG1	>10
5E12	ScFv- человеческий Fc	n.t	6E10	мышиный IgG1	10,48

6A11	ScFv- человеческий Fc	n.t	6F06	мышинный IgG1	7,57
6F05	ScFv- человеческий Fc	4	6F06	мышинный IgG1	7,57
6F11	ScFv- человеческий Fc	n.t	Изотип	мышинный IgG1	Без солюбтизации
6F11	ScFv- человеческий Fc	n.t			
Изотип	ScFv- человеческий Fc	Без солюбтизации			

Пример 11. Дополнительная характеристика кристалл-растворяющих свойств выбранных антител к галектину-10.

Четыре клона, показанные ниже в таблице, были отобраны для дальнейшего анализа.

Таблица 11

## Систематизированные свойства 6F05, 1C09, 1D11 и 4E08

		ELISA на связыва ние	Вiasoge (метод захвата)		Способность образование солюбтизацию	ингибировать CLC и солюбтизацию
Название клона	Формат	EC50 (нМ)	KD (нМ)	kd 1E- 04 (1/с)	100% ингибирование образования CLC (конц. (мкМ)	100% Солюбтизация CLC (конц. (мкМ)
<b>6F05</b>	scFv- человеческий Fc	0,02	0,9	1,2	1,00	4,00
<b>1C09</b>	мышинный IgG1	0,13	0,5	52,9	0,82	10,48
<b>1D11</b>	мышинный IgG1	0,1	1	52,9	0,34	7,86
<b>4E08</b>	мышинный IgG1	3,22	0,8	8,5	1,11	>10

А. Временная солюбтизация CLC под действием 6F05, 1C09, 1D11 и 4E08.

Чтобы лучше задокументировать и охарактеризовать процесс солюбтизации кристаллов CLC антителами против галектина-10 были проведены временные эксперименты на конфокальном микроскопе с вращающимся диском. 2,5 мл аутокристаллизованного раствора CLC (0,7 мг/мл) в PBS наносили пятнами на лунку предметного стекла конфокального микроскопа со стеклянным дном (Ibidi). Затем инициировали солюбтизацию кристаллов, после чего по истечении определенного периода времени добавляли 2 мкл антител против галектина-10 в концентрации 7 мг/мл. Для предотвращения испарения, камеру герметично закрывали вакуумной консистентной смазкой и предметным покровным стеклом. Затем проводили мониторинг растворения CLC, индуцированного 6F05, 1C09, 1D11 и 4E08. Вкратце, раствор, содержащий CLC, наносили пятнами на луночный планшет с  $\mu$ -предметными стеклами, а затем инкубировали с фиксированной концентрацией (8 мг/мл) одного из четырех основных антител против галектина-10. Для каждой лунки были определены положения визуализации, и каждое положение отображалось через каждые 3-5 мин. Эти эксперименты показали, что некоторые антитела против галектина могут солюбтизировать рекомбинантные кристаллы CLC за 1-2 ч, тогда как антитела нерелевантного контрольного изотипа не могут осуществлять такую функцию (фиг. 9А). Кроме того, эти временные эксперименты с высоким разрешением показали, что кристаллы CLC уменьшаются в размере почти исключительно вдоль их самой длинной оси.

Клон 1D11 показал лучшую способность растворять уже существующие CLC (фиг. 9В), где полное

растворение было достигнуто через 1 ч. Клоны 6F05 и 4E08 показали аналогичную способность к растворению CLC более, чем на 90% после инкубирования в течение 90 мин. Антитело мышиноного контрольного изотипа не оказывало влияния на CLC, однако, из-за смещения CLC на поле, программа неверно интерпретировала это как уменьшение пространства, занимаемого CLC.

В. Характеризация связывающих свойств 6F05, 1C09, 1D11 и 4E08 в формате Fab.

Четыре представляющих интерес клон были трансформированы как Fab-фрагменты. На первой стадии, VH и VL каждого клон амплифицировали с помощью ПЦР с использованием специфических праймеров, очищали с помощью электрофореза, расщепляли рестриктирующими ферментами (BsmBI) и лигировали в предварительно расщепленные векторы, содержащие человеческие константные домены: константный домен лямбда человека для VL (pUPEX116.9) или константный домен CH1 для VH (pUPEX86, включая часть шарнирной области). Трансформацию каждого лигированного продукта осуществляли с использованием бактерий Top10 под действием теплового шока и переносили на планшет с агарозой и с ампициллином (ген резистентности векторов). После инкубирования в течение одной ночи, лигированные продукты показали большое число бактериальных моноколоний, тогда как колонии для негативного контроля (пустые векторы) не наблюдались. Для каждого клон (VH и VL) было отобрано от четырех до восьми колоний, которые затем отправляли для секвенирования. Клоны, которые обнаруживали правильную вставку, отбирали и амплифицировали для очистки последовательности ДНК (MidPrep). Затем было инициировано продуцирование 4 основных клонов в клетках млекопитающих. Трансфекцию осуществляли в отношении 1 тяжелой цепи к 1 легкой цепи, включенных в клетки HEK293E посредством полиэтиленимина (PEI). После продуцирования в течение 10 дней, человеческий Fab очищали с использованием сфер с IgG-CH1-сефарозой для отбора путем захвата. И наконец, был проведен анализ с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ для оценки конформации, чистоты и целостности молекул Fab (55 кДа).

Связывающие свойства основных молекул в формате Fab оценивали на связывание с помощью ELISA и BLI с использованием OctetRed96 в соответствии с протоколами, описанными выше. Данные ELISA на связывание (см. ниже табл. 12) показали, что 4 основных молекулы могут быть подразделены на 2 группы по их способности связываться с покрытым галектином-10-His. Клоны 1C09 и 1D11 показали лучшую относительную связывающую способность со значением EC50 в пределах 1,6-1,9 нМ, тогда как клоны 4E08 и 6F5 показали более низкую способность связывания с аффинностью в пределах 25,6-26,7 нМ.

Таблица 12

Характеризация связывающих свойств 4 основных антител против галектина-10 (формат Fab) с помощью ELISA

Конструкции (Fab)	Vmax	EC50 (нМ)
1C09	1,0	1,9
1D11	0,9	1,6
4E08	0,7	25,6
6F05	0,8	26,7

Данные по связыванию, полученные с применением технологии BLI, показали аналогичные результаты, при этом, клоны 1C09 и 1D11 имели лучшую связывающую способность (KD в пределах 10-13 нМ, kd в пределах  $3-3,8 \cdot 10^{-3}$  (1/с)), а клоны 4E08 и 6F05 показали более слабое связывание (KD в пределах 147-188 нМ, kd в пределах  $25-35 \cdot 10^{-3}$  (1/с)) - см. табл. 13.

Таблица 13

Характеризация связывающих свойств 4 основных антител против галектина-10 (формат Fab) с применением технологии BLI

Конструкции (Fab)	KD (нМ)	kd 1E-04 (1/с)
1C09	13,4	3,83
1D11	10,7	2,99
4E08	147	24,8
6F05	188	35,6

Пример 12. Кристаллическая структура Fab-фрагментов к галектину-10 в комплексе с галектином-10.

Была получена кристаллическая структура различных Fab-фрагментов в комплексе с галектином-10, и было показано, как антитела к галектину-10 могут растворять существующие кристаллы. Для структурных исследований, Fab-фрагменты выбранных антител (1D11, 6F5, 4E8, 1C9) были продуцированы в клетках HEK293. Рекombинантный His-меченный галектин-10 в концентрации 1 мг/мл подвергали TEV-расщеплению при комнатной температуре в течение ночи с использованием TEV:галектин-10 в от-

ношении 1:100. Затем очищенный Fab добавляли к расщепленному галектину-10 в молярном избытке 1:25. Затем смесь белков вводили в колонку HiLoad 16/600 с 200 пг Superdex с использованием буфера HBS в качестве рабочего буфера для выделения комплекса галектин-10:Fab. Фракции, соответствующие комплексу галектин-10 Fab, объединяли и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего использования. Комплексы галектин-10:Fab концентрировали до 6-7 мг/мл перед экспериментами по кристаллизации. Эксперименты по кристаллизации посредством паровой диффузии с сидячей каплей в нанолитровом масштабе проводили при 293K с использованием робота-кристаллизатора Mosquito (TTP Labtech) и коммерчески доступных экранов с разреженной матрицей (Molecular Dimensions, Hampton Research).

Кристаллы галектина-10 в комплексе с Fab 1D11 росли в течение ночи в условиях B7 экрана ProPlex (Molecular Dimensions) (0,2 М ацетат аммония, 0,1 М ацетат натрия, pH 4,0, 15% ПЭГ4000). Галектин-10 в комплексе с Fab 6F5 кристаллизовался в течение 24 ч в условиях G7 экрана BCS Eco (Molecular Dimensions) (0,04 М  $\text{CaCl}_2$ , 0,04 М Na-формиат, 0,1 М PIPES, pH 7,0, 8% высококонцентрированного пятна ПЭГ). Через 2 недели появлялись кристаллы галектина-10 в комплексе с Fab 4E8 в условиях B7 экрана PEG/Ion (Hampton Research) (0,2 М нитрат аммония, 20% ПЭГ3350).

Перед мгновенным замораживанием в жидком азоте, кристаллы комплексов галектин-10:Fab подвергали криозащите путем кратковременного вымачивания кристаллов в маточной жидкости с добавлением 25% ПЭГ 400. Дифракционные эксперименты при 100 К проводили на каналах Proxima 2A синхротрона SOLEIL (Gif-sur-Ivette, France) и ID23-2 ESRF (Grenoble, France). Все данные были объединены и масштабированы с помощью пакета программ XDS (Kabsch, 2010). Молекулярную замену (MR) проводили с помощью Phaser (McCoey et al., 2007) с использованием моделей поиска, основанных на структуре галектина-10 (PDB 1LCL) и структуре мышинового Fab высокого разрешения (PDB 5X4G). Создание (повторное создание) модели осуществляли в устройстве COOT (Emsley et al., 2010), и уточнение отдельных координат и ADP осуществляли с помощью PHENIX (Adams et al., 2010) и autoBuster (Bricogne et al., 2017). Инструменты для подтверждения моделей и карт в COOT и пакет программ PHENIX использовали на протяжении всего рабочего процесса для оценки улучшения и подтверждения качества кристаллографических моделей.

Была определена структура трех различных комплексов галектин-10:Fab (для антител 6F5, 1D11 и 4E8) (фиг. 10A-C, табл. 17). Эти структуры показали, что различные антитела нацелены на эпитоп на галектине-10 рядом с остатком Tyr69 (фиг. 10D, F), который, как было обнаружено, является ключевым остатком для аутокристаллизационного поведения галектина-10 (фиг. 3A и C).

Пример 13. Антитела к галектину-10 солибилизируют выращенные у пациента кристаллы галектина-10 в аллергическом муцине *ex vivo*.

Была изучена способность выбранных клонов солибализировать кристаллы, содержащиеся в аллергическом муцине, полученном от пациентов с CRSwNP. Следовательно, эти кристаллы присутствовали в нативной среде слизи и были выращивали *in vivo*. Временные эксперименты по опосредованной антителами солибализации человеческих CLC в слизи проводили следующим образом. 4 мкл CLC-содержащей слизи, выделенной у пациента, наносили пятнами на лунку предметного стекла камеры микроскопа со стеклянным дном (Ibidi). Затем к нанесенной пятнами слизи добавляли 4 мкл антитела против галектина-10 или контрольного антитела (в концентрации 7 мг/мл). Для предотвращения испарения, камеру герметично закрывали вакуумной консистентной смазкой и предметным покровным стеклом. Солибализацию человеческих CLC наблюдали в течение определенного периода времени с помощью конфокального микроскопа с вращающимся диском. Данные, полученные на микроскопе, анализировали с использованием Fiji. Эти временные эксперименты показаны на фиг. 11. Человеческие CLC подвергались такому же процессу солибализации, как и кристаллы рекомбинантного галектина-10, но солибализация занимала больше времени. Однако она была завершена в результате 18-часового инкубирования аллергического муцина с кристалл-растворяющими антителами.

Пример 14. Антитела к галектину-10 ингибируют воспаление дыхательных путей, индуцированное CLC.

Антитела, растворяющие кристаллы, вводили гуманизованным мышам NRG, восстановленным с помощью МКПК индивидуума, страдающего астмой, вызываемой аллергией на HDM (Petros et al. 2009). Поскольку у мыши не продуцируются кристаллы галектина-10, и фракция МКПК не содержит человеческих эозинофилов (источник эндогенного галектина-10 у человека), то кристаллы галектина-10 вводили в дыхательные пути мышей вместе с провокационным заражением HDM. Чрезвычайно трудно адаптивно перенести жизнеспособные человеческие эозинофилы мышам, а поэтому кристаллы галектина-10 пришлось вводить интратрахеально во время заражения аллергеном HDM. Если CLC наблюдались у мышей на 28 день протокола, то они всегда были ассоциированы с образованием слизи, позитивной по периодной кислоте Шиффа (PAS) внутри дыхательных путей, как это наблюдается у пациентов, и что лишь подтверждает правильность подхода адаптивного переноса.

На день 0, мышей NOD Rag<sup>-/-</sup> uc<sup>-/-</sup> (NRG) восстанавливали путем внутрибрюшинной инъекции  $3 \times 10^6$  МКПК. На дни 1-4 и 7-9, всем мышам вводили интратрахеально 20 мкг экстракта клеща домашней пыли (HDM) (Greer), разведенного в 50 мкл PBS. Использование гуманизованных мышей позволило избежать любых побочных эффектов мышинных антител IgG1 к галектину-10, которые неизбежно индуцировались

бы в течение периода времени проведения 28-дневного протокола.

В экспериментах по изучению провоспалительных эффектов кристаллов галектина-10, в дни 1, 3, 7 и 9, мышей NRG обрабатывали по следующим схемам: схема 1, 200 мкг антител контрольного изотипа, вводимых интратрахеально (разведенных в 30 мкл PBS);

схема 2, 10 мкг кристаллов рекомбинантного галектина-10 (1 мкл исходного раствора) + 200 мкг антител контрольного изотипа, вводимых интратрахеально (разведенных в 30 мкл PBS); схема 3, 10 мкг кристаллов рекомбинантного галектина-10 (1 мкл исходного раствора) + 200 мкг антител ID11, вводимых интратрахеально (разведенных в 30 мкл PBS) (фиг. 12 А).

Начиная с дня 11 и далее, мышам интратрахеально вводили инъекции 200 мкг антитела контрольного изотипа или 200 мкг антитела ID11 три раза в неделю до дня разделения. На 27 день всем мышам в последний раз интратрахеально вводили 20 мкг экстракта клещей домашней пыли (Greer), разведенного в 80 мкл PBS. Всех мышей умерщвляли на 28 день.

Через 28 дней, степень воспаления легких (фиг. 12В) была значительно выше у мышей, получавших кристаллы галектина-10+изотип, по сравнению с мышами, которым вводили антитело одного изотипа в течение периода заражения HDM. Обработка антителом ID11 изменяла усиливающее влияние кристаллов галектина-10 на воспаление легких. Кроме того, был проведен слепой морфометрический анализ (с использованием программного обеспечения для анализа изображений QuPath для выявления патологии) в целях оценки степени притока клеток в периметре 500 мкм от базальной мембраны дыхательных путей. Этот анализ выявил заметно увеличенный приток воспалительных клеток вокруг дыхательных путей (фиг. 12Е).

Степень синтеза IgE (фиг. 12С) оценивали с помощью ELISA (см. пример 7). Через 28 дней, концентрация IgE в сыворотке (фиг. 12С) была значительно выше у мышей, получавших кристаллы галектина-10+изотип, по сравнению с мышами, получавшими антитело одного изотипа, в течение периода заражения HDM. Обработка антителом ID11 изменяла усиливающее влияние кристаллов галектина-10 на концентрацию IgE.

Также оценивали наличие метаплазии бокаловидных клеток, измеренное с использованием уровней мРНК муцина MUC5AC. Для этого, замороженную ткань легких собирали в пробирку Эппендорфа и добавляли 1 мл Trizol. Ткань гомогенизировали с использованием гомогенизатора тканей. Для экстракции РНК в пробирки, содержащие гомогенизированное легкое, добавляли 200 мкл хлороформа. После 5-минутного инкубирования, пробирки центрифугировали при 12000×g в течение 15 мин. Верхнюю прозрачную фазу собирали в пробирки Эппендорфа, не содержащие РНКазы, и смешивали с 500 мкл изопропанола и 1 мкл гликогена в течение 10 мин. Пробирки центрифугировали при 12000×g в течение 5 мин. Супернатант сливали, а осадок, содержащий очищенную РНК, промывали 75% этанолом (центрифугирование при 7500×g в течение 5 мин). Гранулы сушили на воздухе в течение 10 мин при комнатной температуре и ресуспендировали в 20 мкл воды, не содержащей РНКазы. Пробирки помещали на 10 мин при 60°C. Концентрацию РНК определяли в каждом образце с помощью прибора Nanodrop. 1 мкг РНК использовали для получения кДНК с помощью набора Sensifast для синтеза к ДНК (Bioline). Оставшуюся РНК замораживали при -80°C. к ДНК разводили водой 10 раз и замораживали до последующего использования. Для проведения ПЦР в реальном времени, для каждой лунки ПЦР-планшета использовали следующую смесь Master: 10 мкл смеси Sensifast SYBR No-Rox, 4,75 мкл воды, 5 мкл кДНК, 0,125 мкл прямого праймера и 0,125 мкл обратного праймера (взятых из 100 мкМ исходного материала), которые добавляли к каждой реакционной ПЦР-смеси. При этом были использованы следующие праймеры: мышинный Muc5ac (Fwd: CTCGCTTAGTCAATAACCACC (SEQ ID NO: 156); Rev: GGAACCTCGTTGGATTGGACTG (SEQ ID NO: 157)); мышинный GAPDH, используемый в качестве гена домашнего хозяйства (Fwd: ACAAAATGGTGAAGGTCGGTG (SEQ ID NO: 158); Rev: TGGCAACAATCTCCACTTTGC (SEQ ID NO: 159)).

Через 28 дней, концентрация мРНК Muc5AC (фиг. 12D) была значительно выше у мышей, получавших кристаллы галектина-10+изотип, по сравнению с мышами, получавшими антитело одного изотипа в течение периода заражения HDM. Обработка антителом ID11 изменяла усиливающее действие кристаллов галектина-10 на концентрацию мРНК MUC5AC. Более подробный гистологический анализ выявил заметно усиленную метаплазию бокаловидных клеток и образование слизи, как было визуально определено по усиленному окрашиванию PAS эпителиальных клеток легких, которые имели типичную форму богатых гранулами бокаловидных клеток.

Бронхиальную гиперреактивность (BHR) также оценивали на модели мышей, поскольку BHR является существенным признаком астмы. Влияние введения CLC на реакцию мышей с механической вентиляцией легких на вдыхаемый бронхосуживающий метахолин оценивали с помощью инвазивного измерения динамического сопротивления FlexiVent (Hammad et al., 2007). Вкратце, мышей анестезировали уретаном и парализовали с помощью D-тубокурарина, затем делали трахеотомию и интубировали катетер 18G с последующей механической вентиляцией с помощью аппарата Flexivent. Через катетер распыляли возрастающие концентрации метахолина в виде аэрозоля (0-200 мкг/мл). Динамическое сопротивление (r<sub>rs</sub>) регистрировали после стандартной ингаляции, проводимой через каждые 10 секунд в течение

2 мин после введения метахолина. Добавление CLC к FIDM увеличивало степень бронхоспазма по сравнению с введением одного HDM, а введение 1D11 полностью нейтрализовало этот эффект (см. фиг. 12F).

#### Ссылки

1. Ackerman, S.J., D.A. Loegering, and G.J. Gleich, *The human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein: biochemical characteristics and measurement by radioimmunoassay*. J. Immunol, 1980. **125**(5): p. 2118-26.
2. Weller, P.F., D.S. Bach, and K.F. Austen, *Biochemical characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase)*. J. Biol Chem, 1984. **259**(24): p. 15100-5.
3. Archer, G.T. and A. Blackwood, *Formation of Charcot-Leyden Crystals in Human Eosinophils and Basophils and Study of the Composition of Isolated Crystals*. J Exp Med, 1965. **122**: p. 173-80.
4. Leonidas D, Elbert BL, Zhou Z-Q, Leffler H, Ackerman SJ, Acharya KR. *Crystal structure of human Charcot-Leyden crystal protein, an eosinophil lysophospholipase, identifies it as a new member of the carbohydrate binding family of galectins*. Structure 1995; **3**:1379-1393.
5. Franke, D., et al., *ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions*. Journal of applied crystallography, 2017. **50**(4): p. 1212-1225.
6. Petoukhov, M.V., et al., *New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis*. Journal of applied crystallography, 2012. **45**(2): p. 342-350.
7. Rambo, R.P. and J.A. Tainer, *Accurate assessment of mass, models and resolution by small-angle scattering*. Nature, 2013. **496**(7446): p. 477.
8. Fischer, H., et al., *Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale*. Journal of Applied Crystallography, 2010. **43**(1): p. 101-109.
9. Schneidman-Duhovny, D., et al., *FoXS, FoXSDock and MultiFoXS: Single-state and multi-state structural modeling of proteins and their complexes based on SAXS profiles*. Nucleic acids research, 2016. **44**(W1): p. W424-W429.
10. Trewthella, J., et al., *2017 publication guidelines for structural modelling of small-angle scattering data from biomolecules in solution: an update*. Acta Crystallographica Section D: Structural Biology, 2017. **73**(9).
11. Kool, M., et al., *An unexpected role for uric acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma*. Immunity, 2011. **34**(4): p. 527-40.
12. Perros, F., et al., *Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation*. Allergy, 2009. **64**(7): p. 995-1002.
13. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. *Features and development of Coot*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2010, **66**(4): p. 486-501.
14. Adams, Paul D., et al. *"PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution."* Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 2010, **66**(2): p. 213-221.
15. Bricogne G., Blanc E., Brandl M., Flensburg C., Keller P., Paciorek W., Roversi P, Sharff A., Smart O.S., Vornrhein C., Womack T.O. (2017). BUSTER. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.
16. Hammad H., et al., *Activation of the D prostanoid 1 receptor suppresses asthma by modulation of lung dendritic cell function and induction of regulatory T cells*. J. Exp. Med. 2007, **204**: p. 357-367.

Таблица 14

Последовательности CDR тяжелой цепи антител scFv, связывающихся с галектином-10

Клон scFv	CDR1	SEQ Q	CDR2	SEQ ID	CDR3	SEQ ID
		ID NO.		NO.		NO.
1D11	DYAMS	1	GISWNGGSTYYAESM KG	2	DRNLGYRLGYPYD Y	3
6F05	SYAMS	4	AINSGGGSTSYADSV KG	5	PGDRLWYYRYDY	6
4E08	TSYYAW S	7	VIASDGSTYYSPSLKS	8	YIRGSSWSGWSAY DY	9
1C09	TNSYYW S	10	AIAYSGSTYYSPSLKS	11	RPNWYRALDA	12
3A03	VYAMS	13	DINTSGDSTTYADSV KG	14	RYTQE	15
1A12	SYYMS	16	AINSGGGSTYYADSV KG	17	NGGIWSFGS	18
2E11	SYAMS	4	PINSGSDSASYVDSVK G	19	ARTSVVAGGMDY	20
4G05	RYWMI	21	SIYNDGGNTYYADSV KG	22	LKAAYYGMDY	23
2C07	SYAMS	4	NINSGGGSTGYADSV KG	24	YLRTYYPNAAF GM DY	25
4B10	NYWMI	26	AIDVGGGTTDYAGSV KG	27	GGSYYGMDY	28
6A11	AYAMN	29	GVNSGGGLTSYGESV KG	30	SKRGAVVAGTGDD Y	31
4H10	DYAMS	1	AISWNGGSTYYAESM KG	32	DLSASGSYYHTFGS	33
6F11	TGPYSW S	34	YIGYSGSTYYSPSLKS	35	SRSSPTTFGMDY	36
2B11	TNYYYYW S	37	AIAYSGSTYYSPSLKS	11	APYGISREYDY	38
5E12	NYPMT	39	AINGGGDIPYYADSV KG	40	QKWGYDPRRTDFE F	41
6A05	SYAMS	4	AINSGGGWTSYVDSV KG	42	YSGPELNTQYGMD Y	43

<b>6A08</b>	SYAMS	4	AINRGGGSTYYADSV KG	44	PGDRLWYYRYDY	6
<b>2F09</b>	TNYFYW S	45	AIAYSGRTYYSPSLKS	46	GPKGLASYDY	47
<b>6F06</b>	RYSMS	48	TINSGGGSTSYVDSVK G	49	SQGGISFSTQYGM DY	50
<b>6B06</b>	TNYYSW S	51	YIAYSGSTSYSPSLKS	52	SRSSPTTFGMDY	36
<b>6E10</b>	SYWMY	53	AINRGGGSTYYADSV KG	54	AGSGVAGTGYDY	55

Таблица 15

Последовательности CDR легкой цепи антител scFv, связывающихся с галектином-10

Клон scFv	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
<b>1D11</b>	AGTSSDVGYGNYVS	56	EVNKRAS	57	ASYRSSNNAV	58
<b>6F05</b>	AGTSSDIGYGNYVS	59	KVSRRAS	60	ASYRYRNNVV	61
<b>4E08</b>	QGGNFGYYYYGS	62	KDSERPS	63	QSADSSDNPV	64
<b>1C09</b>	QGANLGRYYGI	65	GDSNRPS	66	QSYESSTSPV	67
<b>3A03</b>	KPGRTLVHTDGRTYL Y	68	QVSNRGS	69	AQATYYPLT	70
<b>1A12</b>	QGGNFGYYYYVS	71	GDSNRPS	66	LSYESSDYPV	72
<b>2E11</b>	QGGKFGSYYVS	73	KDNERPS	74	QSGSSSDNIV	75
<b>4G05</b>	QGANLGRYYGI	65	GDSNRPS	66	QSYESSTSPV	67
<b>2C07</b>	QGGNFGRYYAS	76	RDSEKPS	77	QSGRSSDNAV	78
<b>4B10</b>	QGAKLGRYYGI	79	GDSNRPS	66	QSYESSTSPV	67
<b>6A11</b>	QGGNFGRYYVS	80	KDSERPS	63	QSGSSSDNAV	81
<b>4H10</b>	AGTSSDVGYGDYVS	82	KVKTRAS	83	ASYKNGGTAV	84
<b>6F11</b>	QGGDFGRYYVA	85	QDSEKPS	86	QSGISSDNI	87
<b>2B11</b>	QGGKFGRYYAS	88	KDSERPS	63	QSGRSSDNAV	78
<b>5E12</b>	KSSQSVRIESNHKTYL N	89	DASSRES	90	QQAYAAPT	91
<b>6A05</b>	QGGNFGSYYAS	92	RDSGRPS	93	QSGSSSDNTV	94
<b>6A08</b>	GLSSGSVTSSNYPG	95	NTNSRYS	96	ALNRVRGTYRV	97
<b>2F09</b>	QGGNFGYYYYVS	71	RDSGRPS	93	QSGSSSDNTV	94
<b>6F06</b>	QGGNFGRYYAN	95	KDSERPS	63	QSGSVSDNAV	96
<b>6B06</b>	QGGNFGRYYVS	80	QDSEKPT	97	QSGTSSDNI	98
<b>6E10</b>	QGGNFGYYYYVS	71	RDSGRPS	93	QSGSSSDNAV	81

## Последовательности VH и VL антител scFv, связывающихся с галектином-10

Клон scFv	VH	SEQ ID NO.	VL	SEQ ID NO.
1D11	QVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFDDY AMSWVRQAPGKGLEWVSGISWNGGSTYYAES MKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSKSEDTAVY YCAKDRNLGYRLGYPYDYWGQGTQVTVSS	99	QSVLTQPPSVSGSPGETVTISCAGTSSDVGYGNYVSW YQQLPGMAPRLLIYEVNKRASGITDRFSGSKSGNTASL TISGLQSEDEGDYCYASYRSSNNAVFGGGTHLTVL	100
6F05	QLQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGGSTYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSKPEDTAVYY CATPGDRLWYYRYDYWGQGTQVTVSS	101	QAGLTQPPSVSGTLGKAVTISCAGTSSDIGYGNYVSW YQQLPGTAPKLLIYKVSRRASGVPDFRSGSKSGNTASL SISGLQSEDEADYCYASYRYRNNVVFVGGGTHLTVL	102
4E08	QVQRQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSITTSY YAWSWIRQPPGKGLEWVGVIASDGSTYYSPSL KSRTSISRDTSKNQFSLQLSSVTPEDTAVYYCA LYIRGSSWSGWSAYDYWGQGTQVTVSS	103	QPVLNQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGYYYGSWYQ QKPGQAPVLYIKDSERPSGIPERFSGSSSGGTATLTIS RAQAEDEADYCYQASDSSDNPVFGGGTHLTVL	104
1C09	QVQLVESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSITTSY YYWSWIRQPPGKGLEWVGAIAYSGSTYYSPSL KSRTSISRDTSKNQFSLQLSSVTPEDTAVYYCA RRPNWYRALDAWGQGTQVTVSS	105	NFMLTQPSAVSVSLGQTARITCQGANLGRYYGIWYQQ KPGQAPVQVIYGDSNRPSGIPERFSGSSSGGTATLTISG AQAEDEADYCYQSYESSTSPVFGGGTHLTVL	106
3A03	QVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCATSGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVADINTSGDSTTYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSKPEDTAVYY CANRYTQERGGTQVTVSS	107	DVVLQTTPGSLVVPGEAASISCKPGRITLVHTDGRTYL YWLQKPGQRPQLLIYQVSNRSGVPDFRFTGSGSGTD FTLKISGVKAEDAGVYCAQATYPLTFGSGTRLEIK	108
1A12	QVQLVESGGGLVQPGGSLRVSCAASGFTFSSY YMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGGSTYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSKSEDTAVYY CVQNGGIWSFGSWGQGTQVTVSS	109	SSALTQPSAISVSLGQTARITCQGGNFGYYYVSWYQQ KPGQAPVQVIYGDSNRPSGIPERFSGSSSGGTATLTISG AQAEDEADYCYCLSYESSDYPVFGGGTHLTVL	110
2E11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSPINSGSDSASYVDS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSKPEDTAVYY CAKARTSVVAGGMDYWGKGTQVTVSS	111	QSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGGKFGSYYVSWYQQ KPGQAPVMVIYKDNERSGIPERFSGSSSGSTLTISG AQAEDEGTYCYQSGSSSDNIVFGGGTELTVF	112
4G05	QLQVVESGGGLVQTGGSLTLCSTTSGFTFSRY WMIWVRQAPGKGLEWVSSIYNDGGNTYYADS VKGRFTISRDNSENTLYLQMNLSKSEDTAVYY CAKLKAAYYGMDYWGKGTQVTVSS	113	SSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGANLGRYYGIWYQQ KPGQAPVQVIYGDSNRPSGIPERFSGSSSGGTATLTISG AQAEDEADYCYQSYESSTSPVFGGGTHLTVL	114
2C07	ELQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSNINSGGGSTGYADSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNLSKPEDMAVYY CAKYLRITYYPNAAFGMDYWGKGTQVTVSS	115	QAVLTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGFRYYASWYQ QKPGQAPVLYYRDSERPSGIPERFSGSSSGDTATLTIS GAQAEDEADYCYQSGRSSDNAVFGGGTHLTGL	116
4B10	QLQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSSNY WMYWVRQAPGKGLEWVSAIDVGGGTTDYAG SVKGRFTISRDNKSTVYLYQMNLTLPEDTALY YCLRGGSYYGMDYWGKGTQVTVSS	117	QSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGAKLGRYYGIWYQQ KPGQAPVQVIYGDSNRPSGIPERFSGSSSGGTATLTISG AQAEDEADYCYQSYESSTSPVFGGGTHLTVL	118
6A11	ELQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCSASGFTFGAY AMNWVRQAPGKGLEWVSGVNSGGGLTSYGE SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNRLNPDDTAVY	119	SSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGFRYYVSWYQQ KPGQAPVLYYKDSERPSGIPERFSGSSSGDTATLTISG AQAEDEADYCYQSGSSDNAVFGGGTHLTVL	120

	YCAKSKRGAVVAGTGDDYWGQGTQVTVSS			
4H10	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDY AMSWVRQAPGKGLEWVSAISWNGGSTYYAES MKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSKSEDAAVY YCAKDLASAGSYHYHFGSWGQGTQVTVSS	121	QAGLTQPPSVAGTLGKTVTISCAGTSSDVGYGDIYSW YQHIPGTAPKLLIYKVKTRASGIPDRFSGSKSGNTASLT ISGLQSGDESDYYCASYKNGGTAVFGGGTHLTVL	122
6F11	QVQRQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSITTGP YSWSWIRQPPGKGLEWIGYIGYSTYYSPSLK SRTSISRDTSNQFSLQLSSVTPEDTAVYYCAR SRSSPTTFGMDYWGKGLTVTVSS	123	SSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGGDFGRYYVAWYTQ KPGQAPVLYIQDSERPSGIPERFSGSSSGDTATLTISG AQAEDAEEYCCQSGISSDNIVFGGGTHLTVL	124
2B11	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSITTNY YYWSWIRQPPGKGLEWMAIAYSSTYYSPSL KSRTSISRDTSKNQFTLQLSSVTPEDTAVYYCA RAPYGISREYDYWGQGTQVTVSS	125	HSAVTQPSAVSVSLGQTARITCQGGKFGRIYASWYQ QKPGQAPVLYIKDSERPSGIPERFSGSSSGDTATLSIS GAQAEDAEDYFCQSGRSSDNAVFGGGTHLTVL	126
5E12	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFRNY PMTWVRQAPGKGPWVSAINGGGDIPYYADS VKGRFTISRDNKNTVYLQMDSLKPEDTAMY YCAKQKWGYDPRRTDFEFRGQGTQVTVSS	127	ETVPTQSPSSVTASVGEKVTITCKSSQSVRIESNHKTYL NWXQQRPRGRPLLIYDASSRESGIPDRFSGSGSTSD TLTISSVQPEDAAVYYCQAYAAPTFGGQTKLEIK	128
6A05	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGGWTSYVD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLKPEDTAVY YCTKYSPELNTQYGMIDYWGKGLTVTVSS	129	NFMLTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGSYYASWYQ QKPGQAPVLYIYRDSGRPSGIPERFSGSSSGDTATLTIS GAQAEDAEDYCCQSGSSSDNTVFGGGTHLTVL	130
6A08	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGPWVSAINRGGGSTYYADS	131	QTVVTQEPVLSVSPGGTVTLTCLSSGVTSSNYPGWY QQTPGQAPRLLIYNTNSRYSVGNRFSGISGNKAALII	132
	VKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSKPEDAAVY YCATPGDRLWYYRYDYWGQGAQVTVSS		SGAQPEDEADYHCALNRVRGTYRVFGGGTHLTVL	
2F09	QVQVQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSITTNY FYWSWIRQSPGKGLEWIGAIAYSGRTYYSPSL KSRTSISRDTSNQFTLQLSSVTPEDTAVYYCA RGPGLASYYDYWGQGTQVTVSS	133	SSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGYYVSWYQQ KPGQAPVLYIYRDSGRPSGIPERFSGSSSGDTATLTISG AQAEDAEDYCCQSGSSSDNTVFGGGTHLTVL	134
6F06	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASEFTFSRYS MSWVRQAPGKGLEWVSIINSGGGSTSYVDSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNLSKPEDTAVYYC TKSQGGISFSTQYGMIDYWGKGLTVTVSS	135	NFMLTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGRIYANWYQ QKPGQAPVLYIKDSERPSGIPERFSGSSSGDTATLTIS GAQAEDAEDYCCQSGSVSDNAVFGGGTHLAVL	136
6B06	QVQRQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSITTNY YSWSWIRQPPGKGLEWIGYIAYSSTYSYSPSLK SRTSISRDTSNQFSLQLSSVTPEDTAVYYCAR SRSSPTTFGMDYWGKGLTVTVSS	137	SSALTQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGRIYVSWYTQ KPGQAPVLYIQDSERPTGIPERFSGSSSGDTATLTISG AQAEDAEDYCCQSGTSSDNIVFGGGTHLTVL	138
6E10	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY WYVVRQAPGKGLEWVSAINTGGGSTYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSKPEDTALY YCARAGSGVAGTYDYWGQGTQVTVSS	139	QPVLNQPSAVSVSLGQTARITCQGGNFGYYVSWYQ QKPGQAPVLYIYRDSGRPSGIPERFSGSSSGDTATLTIS GAQAEDAEDYCCQSGSSSDNAVFGGGTHLTVL	140

## Рентгеновские данные и статистика уточнения

	Рекомбинант ный Gal10	Кристалл CLC <i>Ex vivo</i>	Рекомбинант ный Gal10-Tyr69Glu	Рекомбинантный Gal10:Fab-1D11	Рекомбинантный Gal10:Fab-6F5	Рекомбинантн ый Gal10:Fab-4E8
Линия луча	P14 (PetraIII)	P14 (PetraIII)	PXIII (SLS)	ID23-2 (ESRF)	ID23-2 (ESRF)	Proxima 2A
						(SOLEIL)
Лиганды	глицерин	глицерин	PG4, PG6, PGE	PG4	Ca <sup>2+</sup> , PGE	/
Условия кристаллизации	PBS	PBS	0,2М сульфат аммония pH 5.1 20% ПЭГ <sub>3350</sub>	0,2М сульфат аммония 0,1 М ацетат натрия pH 4.0 15% ПЭГ <sub>4000</sub>	0.04 М CaCl <sub>2</sub> , 0,04 М формиат натрия, 0.1 М PIPES pH 7.0 8% крапное пятно ПЭГ	0.2 М нитрат аммония 20% ПЭГ <sub>3350</sub>
крио	35% глицерин	35% глицерин	25% ПЭГ <sub>400</sub>	25% ПЭГ <sub>400</sub>	25% ПЭГ <sub>400</sub>	20% ПЭГ <sub>400</sub>
<b>Сбор данных</b>						
Длина волны	0.9763	0.9763	0.99998	0.87313	0.87313	0.980058
Спейсерная группа	P 6522	P 6522	P 21	P 21 21 21	C 2 2 21	P 21
Размер ячейки						
<i>a, b, c</i> (Å)	48.88, 48.88, 258.64	48.86, 48.86, 257.88	72.82, 93.30, 93.07	61.63, 89.22, 249.27	59.01, 146.19, 185.70	41.33, 150.45, 94.50
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.00, 90.00, 120.00	90.00, 90.00, 120.00	90.00, 108.94, 90.00	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 96.31, 90.00
Разрешение (Å)	50.00-1.34 (1.42-1.34)	50.00-2.22 (2.35-2.22)	50.00-2.10 (2.23-2.10)	50.00-1.90 (2.02-1.90)	50.00-1.91 (2.02-1.91)	50.00-3.39 (3.60-3.39)
$R_{meas}$	7.6 (71.5)	30.7 (194.6)	15.4 (227.8)	23.4 (137.0)	23.6 (215.1)	21.9 (107.0)
$I / \sigma I$	25.64 (5.81)	7.85 (1.29)	9.33 (0.70)	6.72 (1.30)	7.67 (1.00)	5.09 (1.05)
Заполненность (%)	92.4 (68.3)	99.9 (99.1)	99.0 (98.6)	99.1 (94.6)	99.7 (98.3)	98.4 (98.1)
Избыточность	17.9 (14.65)	11.86 (12.20)	6.90 (6.74)	6.40 (5.99)	12.85 (11.44)	3.22 (3.33)
Фактор В Уильсона	10.13	23.36	39.68	20.09	25.08	81.87
<b>Уточнение</b>						
Разрешение (Å)	43.10-1.38	43.06-2.30	47.30-2.10	46.97-1.90	47.24-1.91	46.97-3.39
Кэф. отражения	37 604	10 056	68 227	107 597	63 022	15 645
$R_{work}/R_{free}$	16.81/17.94	18.26/23.54	17.24/20.43	17.47/22.34	16.61/20.11	31.74/34.44
Число атомов						
Белок	1248	1122	6766	8812	4452	8344
Лиганд/ион	6	6	112	13	11	/
Вода	209	129	648	1457	835	/
<i>B</i> -фактор						
Белок	15.04	28.68	50.77	26.14	38.06	133.84
Лиганд/ион	25.31	53.67	70.35	65.21	71.99	/
Вода	36.26	45.50	60.13	40.34	52.48	/
Отклонение						
рамановского рассеяния						
Длины связи (Å)	0.005	0.010	0.010	0.010	0.010	0.008
Углы связи (°)	0.91	1.14	1.12	1.14	1.09	1.16

Пример 15. Получение дополнительных антител к галектину-10.

Дополнительные антитела к галектину-10 отбирали путем биопэннинга против галектина-10 чело-

века и собакоподобных обезьян и скринировали с помощью ELISA и BLI на связывание с галектином-10 (человека и собакоподобных обезьян).

Последовательности трех изоформ галектина-10 собакоподобных обезьян (WGS, REF и YRT) показаны ниже вместе с последовательностью человека.

Чел.

MSLLPVPYTEAASLSTGSTVTIKGRPLACFLNEPYLQVDFHTEMKEESDIVHFHFQVCFGR  
RVVMNSREY

WGS:

MSLLSVPHTESVSLSTGSTVTIKGRPLVCFLNEPHLQVDFHTEMKEDSDIAFHQVYFVG  
RVVMNSREF

REF:

MSLLSVPHTESVSLSTGSTVTIKGRPLVCFNEPHLQVDFHTEMKEDSDIAFHQVYFVG  
RVVMNSREF

YRT:

MSLLSVPHTESVSLSTGSTVTIEARPLVCFNEPHLQVDFHTEMKEDSDIAFHQVYFVG  
RVVMNSREY

GAWKQQVESKNMPFQDQGEFELSISVLPDKYQVMVNGQSSYTFDHRIPPEAVK  
MVQVWRDISLTKFNVSYLKR

KIWKEEVESKNMPFQDQGEFELSILVLEDKYQVMVNGQAYYFNHRIPVSSVKMVQV  
WRDISLTKFNVS---

KIWKEEVESKNMPFQDQGEFELSILVLEDKYQVMVNGQAYYFNHRIPVSSVKMVQV  
WRDISLTKFNVS---

RTWKKEEVESKNMPFQDQGEFELRILVLEDKYQVMVNGQAYYFNHRIPVSSVK  
MVQVWRDISLTKFNVS---

(WGS: SEQ ID NO: 267; REF: SEQ ID NO: 268; YRT: SEQ ID NO: 269)

Анализ последовательностей человека и 3 изоформ собакоподобных обезьян выявил, что: изоформы галектина-10 собакоподобных обезьян на 78-81% идентичны галектину-10 человека.

Изоформы WGS и REF отличаются одной аминокислотой в положении 31 (F/L).

Изоформа YRT содержит 6 различных аминокислот, отличающихся от аминокислот изоформы REF в положениях 23 (K/E), 24 (G/R), 69 (F/Y), 70 (K/R), 71 (I/T) и 92 (S/R).

Только изоформа YRT имеет остаток тирозина в положении 69, как и у человека.

Одиннадцать клонов scFv, которые продемонстрировали связывание с галектином-10, секвенировали и превращали в гибридные молекулы человеческого Fc, как описано в примере 8.

А. Скрининг scFv с помощью ELISA и технологии биослойной интерферометрии (BLI).

(i) ELISA-анализ.

Способность связывания scFv (периплазматического экстракта) с галектином-10 человека и с двумя доступными изоформами галектина-10 собакоподобных обезьян (WGS и REF) анализировали с помощью ELISA на связывание. Вкратце, планшет maxisorp покрывали в течение ночи 1 мкг/мл человеческого галектина-10-His или изоформы галектина-10-His WGS или REF собакоподобных обезьян, а затем блокировали PBS с 1% казеином перед инкубированием с периплазматическим экстрактом (разведение 1/5 в PBS с 0,1% казеином), содержащим меченный scFv-Мус. Детектирование связывания осуществляли с использованием ПХ-конъюгированного антитела против Мус (Bethyl, каталог A190-105P). Затем добавляли субстрат ТМВ, и реакцию останавливали добавлением 0,5М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Поглощение измеряли на 450 нм (эталон на 620 нм) с помощью прибора Тесан. И наконец, необработанные данные (значения OD) были отложены на графике с использованием GraphPad Prism 7.01 и показаны на фиг. 13. Число связывающихся scFv определяли по значению OD выше 0,5 на планшет MP и библиотеку. Были включены пустой контроль и негативный контроль (связывание периплазматического экстракта scFv с нерелевантной мишенью), которые, как и ожидалось, не показали связывания.

Результаты показали, что значительное количество scFv, связывающихся с галектином-10 человека или собакоподобных обезьян, было выделено после последнего раунда отбора. Однако, между планшетами Master наблюдалась значительное различие в обогащении связывающимися молекулами человека и собакоподобных обезьян (изоформы REF и WGS), то есть, 10,6-87% связывающихся молекул человека и 0-92,6% связывающихся изоформ WGS и REF собакоподобных обезьян. Для обеих L-аминокислот, библиотека лямбда показала явно более высокий процент связывания scFv с галектином-10 человека или собакоподобных обезьян, чем библиотека каппа. В частности, это имело место в случае библиотеки 1K, которая показала 0-4% связывающихся молекул собакоподобных обезьян (изоформы WGS и REF). В

противоположность этому, библиотеки 1L и 2L показали 76-92,6% связывающихся молекул человека и собакоподобных обезьян, что указывает на то, что библиотека лямбда может быть средним поставщиком перекрестно реагирующих связывающихся молекул человека и собакоподобных обезьян. Планшеты Master, полученные в условиях, в которых применялась элюирование при кислотном pH (MP07 и MP08), также показали относительно высокий процент связывающихся молекул человека и собакоподобных обезьян, где 0-60,9% связывающихся молекул соответствовали библиотекам каппа, а 76,1-89,1% связывающихся молекул соответствовали библиотекам лямбда. Как и ожидалось, из-за их чрезвычайно близкой гомологии, общая тенденция для scFv показала аналогичное связывание с изоформами WGS и REF галектина-10-His собакоподобных обезьян.

Таблица 18

ELISA-скрининг на связывание периплазматических экстрактов scFv из MP, полученных после отбора

Число MP	Библиотека	Галектин-10-His	Мишени	% Мишеней
MP07	1K	Человеческий	24	52,2
		WGS собакоподобных обезьян	1	2,2
		REF собакоподобных обезьян	0	0,0
	1L	Человеческий	41	89,1
		WGS собакоподобных обезьян	41	89,1
		REF собакоподобных обезьян	41	89,1
MP08	2K	Человеческий	5	10,9
		WGS собакоподобных обезьян	28	60,9
		REF собакоподобных обезьян	28	60,9
	2L	Человеческий	35	76,1
		WGS собакоподобных обезьян	36	78,3
		REF собакоподобных обезьян	38	82,6
MP09	1K	Человеческий	58	61,7
		WGS собакоподобных обезьян	0	0,0
		REF собакоподобных обезьян	4	4,3
MP10	1L	Человеческий	82	87,2
		WGS собакоподобных обезьян	87	92,6
		REF собакоподобных обезьян	87	92,6
MP11	2L	Человеческий	76	80,9
		WGS собакоподобных обезьян	80	85,1
		REF собакоподобных обезьян	79	84,0
MP12	2K	Человеческий	10	10,6
		WGS собакоподобных обезьян	59	62,8
		REF собакоподобных обезьян	59	62,8

(ii) Анализ BLI.

Из шести планшетов Master, приготовленных во время отбора, был взят 321 клон, которые продемонстрировали связывание у человека и собакоподобных обезьян во время эксперимента с помощью ELISA-скрининга, и их связывающая способность была протестирована на BLI с использованием Octet RED96. Вкратце, изоформы WGS или REF His-меченного галектина-10 человека и собакоподобных обезьян разводили в кинетическом буфере (PBS: 0,01% BSA и 0,002% Твина 20) при 200 мкг/мл, а затем захватывали наконечниками датчика с антителом против Penta His 1K (ForteBio, № по каталогу 18-5120) до тех пор, пока не был достигнут уровень иммобилизации 1 нм. Затем наносили разбавленные периплазматические экстракты (1/5 в кинетическом буфере), содержащие клон scFv, и измеряли ассоциацию/диссоциацию с иммобилизованным галектином-10-His с использованием программы для анализа данных ForteBio 9.0 (с вычитанием контрольных наконечников, модель связывания 1.1). Во время скрининга можно было определить только диссоциацию (скорость диссоциации) scFv, поскольку эффективная концентрация scFv была неизвестна и может значительно варьироваться от клона к клону. Результаты подтвердили, что большинство отобранных клонов scFv обладали перекрестной реактивностью с мо-

лекулами человека и собакоподобных обезьян (см. фиг. 14).

В. Характеризация панели scFv - человеческого Fc.

ELISA и ППП на T3000 Biotec проводили для оценки связывающих свойств панели scFv-человеческого Fc.

(i) ELISA-анализ.

В эксперименте, аналогичном эксперименту, проводимому во время первоначального скрининга, относительные свойства связывания 11 новых клонов scFv-человеческого Fc анализировали с помощью ELISA. Вкратце, планшет maxisorp покрывали в течение ночи изоформами галектина-10-His WGS или REF человека или собакоподобных обезьян в концентрации 0,2 мкг/мл, а затем блокировали PBS с 1% казеином перед инкубированием с серийным разведением гибридных молекул scFv-человеческого Fc (от 100 нМ, разведение 1/5, 8 точек разведения). После нескольких стадий промывки осуществляли детектирование связанного scFv-человеческого Fc с использованием ПХ-конъюгированного антитела против человеческого Fc (Jackson ImmunoResearch, Каталог 109-035-008). Поглощение измеряли на 450 нм (эталон на 620 нм) с помощью прибора Tecan. И наконец, необработанные данные (значения OD) были отложены на графике с использованием GraphPad Prism 7.01. Значения EC50 для каждого антитела рассчитывали с помощью нелинейной регрессии (log(агонист) по наклону кривой результирующих переменных (четыре параметра)), и эти величины представлены ниже в табл. 19. В качестве позитивного контроля включали клон 6F05 из предыдущей панели антитела к галектину-10.

Таблица 19

Характеризация данных ELISA на связывание антител к галектину-10 для панели scFv-человеческого Fc

Клон (scFv-человеческого Fc)	Человеческий Gal10-His (0,2 мкг/мл)		Gal10-His_WGS собакоподобных обезьян (0,2 мкг/мл)		Gal10-His_YRT собакоподобных обезьян (0,2 мкг/мл)	
	Vmax	EC50 (нМ)	Vmax	EC50 (нМ)	Vmax	EC50 (нМ)
7B07	0,6	1,11	0,6	0,82	0,0	Отсутствие связывания
7C05	1,0	0,67	1,5	неоднозначные	2,1	2,53
7D10	1,5	неоднозначные	2,3	неоднозначные	2,3	неоднозначные
7E09	2,0	1,48	2,9	1,66	2,3	1,64
8H11	2,3	0,18	3,1	0,13	3,1	0,10
10A06	1,2	0,08	2,5	0,10	3,0	0,04
10B02	2,2	0,09	3,3	0,05	3,2	0,05
10D02	1,9	0,56	3,1	1,12	2,0	1,40
10H06	1,9	0,63	2,9	0,90	2,4	0,96
11F02	1,5	0,77	2,5	неоднозначные	2,5	неоднозначные
11F12	1,8	0,56	3,1	0,23	3,0	0,24
6F05	2,4	0,02	0,3	неоднозначные	0,3	неоднозначные

Связывание панели scFv-человеческого Fc с покрытым галектином-10 человека и собакоподобных обезьян показало относительную связывающую способность в интервале 0,08-1,48 нМ для человека и 0,04-2,53 нМ для изоформ WGS и YRT галектина-10 собакоподобных обезьян. Были сделаны следующие наблюдения:

Позитивный контрольный клон 6F05 показал лучшую относительную способность панели scFv связываться с человеческой мишенью (значение EC50 0,02 нМ и значение OD 2,4 как Vmax). Однако этот клон показал слабое связывание с обеими изоформами собакоподобных обезьян (неоднозначное соответствие и значение Vmax, равное 0,3 OD).

Клоны 10A06, 10B 02 и 8H11 показали лучшую относительную связывающую способность со значениями EC50 в интервале 0,08-0,18 нМ для человеческого галектина-10 и в интервале 0,04-0,13 нМ для обеих изоформ галектина-10 собакоподобных обезьян.

За исключением клона 7C05, остальная часть панели scFv-человеческого Fc показала аналогичные профили связывания на 2 изоформах галектина-10 собакоподобных обезьян.

(ii) Анализ ППР.

Связывающие свойства панели scFv-человеческого Fc с галектином-10 анализировали на Biacore T3000. Для этой цели, чип CM5 покрывали поликлональным антителом против человеческого Fc при 8000 RU, а затем фиксированную концентрацию панели scFv-человеческого Fc (1,5 мкг/мл) захватывали для достижения сигнала связывания приблизительно 150 RU. И наконец, вводили серийное разведение изоформы WGS галектина-10-His человека или собакоподобных обезьян (серийное разведение, 1/2 из 5 мкг/мл, 6 точек разведения). Необработанные данные анализировали с помощью компьютерной программы для оценки ВИА с вычитанием фона (4-3). И наконец, Kd/KD и Rmax каждой панели scFv-человеческого Fc к галектину-10-His определяли по кривой зависимости кинетики одновременного связывания при ka/kd/связывания с переносом массы/локального Rmax с помощью компьютерной программы для оценки ВИА. Результаты показаны ниже в таблице.

Таблица 20

Характеризация связывающих свойств панели антител scFv-человеческого Fc к галектину-10 на Biacore T3000

Название	Biacore-связывание (метод захвата) scFv-человеческого Fc									
	с человеческим Gal10-His					с Gal10-His_WGS собакоподобных обезьян				
	ka (1/мс) E05	kd (1/с) 04	E-Rmax	KD (нМ)	ka (1/мс) E05	kd (1/с) 04	E-Rmax	KD (нМ)		
007B07	15,0	12,4	90,0	0,8	500,0	766,0	37,0	1,5		
007C05	9,9	12,4	31,0	1,3	3,8	1,4	10,0	0,4		
007D10	7,9	22,2	28,0	2,8	1,8	5,8	35,0	3,2		
007E09	5,4	19,0	19,0	3,5	4,9	17,4	14,0	3,6		
008H11	4,53	8,2	55	1,8	17,5	16,1	41	0,9		
010A06	9,1	2,5	42,0	0,3	6,6	3,5	27,0	0,5		
010B02	5,0	8,1	39,0	1,6	7,7	8,0	52,0	1,0		
010D02	3,4	6,6	39,0	2,0	4,5	12,2	24,0	2,7		
010H06	3,2	5,6	40,0	1,8	3,4	26,2	15,0	7,8		
011F02	3,7	20,3	22,0	5,4	2,4	18,5	21,0	7,9		
011F12	3,2	7,2	40,0	2,3	75,4	112,0	35,0	1,5		

В соответствии с вышеуказанными данными ELISA на связывание, панель гибридных молекул scFv-человеческого Fc показала различные свойства связывания с изоформой WGS галектина-10-His человека и собакоподобных обезьян. Были сделаны следующие наблюдения.

Панель scFv-человеческого Fc показала аффинность в пределах 0,3-5,4 нМ в отношении человеческого галектина-10-His человека и 0,5-7,9 нМ в отношении изоформы WGS галектина-10-His собакоподобных обезьян.

Клоны 10A06, 7B07 и 7C05 показали наивысшую аффинность (от 0,3 нМ до 1,3 нМ, соответственно) со скоростью диссоциации от  $2,5^{E-04} \text{ с}^{-1}$  до  $12,4^{E-04} \text{ с}^{-1}$  для человеческого галектина-10-His. Клон 7B07 показал самую быструю скорость ассоциации ( $15^{E05} \text{ 1/мс}$ ) и Rmax (90 RU) для этой панели.

Панель scFv-человеческого Fc показала в 2 раза меньшее значение Rmax для галектина-10-His собакоподобных обезьян по сравнению с человеческой мишенью.

Клоны 7C05, 10A06, 8H11 показали самую высокую аффинность (от 0,4 нМ до 0,9 нМ, соответственно) со скоростью диссоциации от  $1,4^{E-04} \text{ с}^{-1}$  до  $8^{E-04} \text{ с}^{-1}$  для изоформы WGS галектина-10-His собакоподобных обезьян. Клон 7B07 показал самую быструю скорость ассоциации ( $500^{E05} \text{ 1/мс}$ ) и диссоциации ( $766^{E-04}$ ) данной панели.

С. Трансформация выбранных клонов scFv в остов мышиного IgG1 Семь отобранных основных молекул, как показано в таблице ниже, были повторно клонированы в остов мышиного IgG1 для дальнейшей характеристики.

Таблица 21

Панель клонов scFv, трансформированных в остов мышинового IgG1

Клон ScFv- hFc	Семейств во VH	Семейств во VL	bELISA	bELISA	bELISA	Biacore			Biacore			WGS
			A hGal10	A сyноG a110- WGS	сyноGal10- YRT	человеческого Gal10			собакоподобных обезьян			
			EC50 (нМ)	EC50 (нМ)	EC50 (нМ)	ka (1/мс) E05	kd (1/с) E-04	KD (нМ)	ka (1/мс) E05	kd (1/с) E-04	KD (нМ)	
007B0 7	2	9	1,11	0,82	Не связывались	15,0	12,4	0,8	500,0	766,0	1,5	
008H1 1	7	10	0,18	0,13	0,10	4,53	8,2	1,8	17,5	16,1	0,9	
010A0 6	12	34	0,08	0,10	0,04	9,1	2,5	0,3	6,6	3,5	0,5	
010B0 2	5	26	0,09	0,05	0,05	5,0	8,1	1,6	7,7	8,0	1,0	
010D0 2	6	17*	0,56	1,12	1,40	3,4	6,6	2,0	4,5	12,2	2,7	
011F0 2	7b	33	0,77	10,41	Неоднознач ные	3,7	20,3	5,4	2,4	18,5	7,9	
011F1 2	7	16	0,56	0,23	0,24	3,2	7,2	2,3	75,4	112,0	1,5	

Последовательности CDR, VH и VL этих семи антител показаны в табл. 32, 33 и 34 ниже.

Для такой трансформации, области VH и VL каждого клона амплифицировали с помощью ПЦР и клонировали с сохранением рамки считывания в экспрессионный вектор, кодирующий константные домены мышинового IgG1.

Получение мышинового IgG1 против галектина-10 осуществляли путем трансфекции в отношении 1 тяжелая цепь к 3 легким цепям, включенным в клетки НЕК293Е посредством полиэтиленimina (PEI). После 6-дневного продуцирования, мышинные моноклональные антитела очищали из клеточного супернатанта с использованием сфер с белком А-сефарозой. И наконец, был проведен анализ с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ для оценки чистоты и целостности антител (молекулярная масса равна 150 кДа).

Пример 16. Характеризация антител к галектину-10 в формате мышинового IgG1.

А. Характеризация связывающих свойств панели мышинных IgG1 с галектином-10.

(i) ELISA-анализ.

В эксперименте, аналогичном эксперименту, проводимому во время характеризации молекул scFv-человеческого Fc, относительные свойства связывания 7 мышинных антител IgG1 анализировали с помощью ELISA. Планшет maxisorp покрывали в течение ночи 0,5 мкг/мл изоформы WGS или YRT галектина-10-His человека или собакоподобных обезьян. Затем серийное разведение каждого клона (от 100 нМ, разведение 1/4, 12 точек разведения) инкубировали на покрытом галектине-10. После нескольких стадий промывки, детектирование связанного мышинового IgG1 проводили с использованием ПХ-конъюгированного антитела против мышинового Fc (DAMPO, Jackson ImmunoResearch, Каталог 715-035-150). Поглощение измеряли на 450 нм (эталон на 620 нм) с помощью прибора Tecan. Необработанные данные (значения OD) были отложены на графике с использованием GraphPad Prism 7.01. Значения EC50 для каждого антитела рассчитывали с помощью нелинейной регрессии (log(агонист) по наклону кривой результирующих переменных (четыре параметра)), и эти величины представлены ниже в таблице. Для сравнения было включено антитело ID11 из предыдущей панели.

Характеризация связывающих свойств панели мышинных IgG1 с помощью ELISA

Клоны (мышинного IgG1)	Человеческий Gal10-His (0,5 мкг/мл)		Gal10-His_WGS собакоподобных обезьян (0,5 мкг/мл)		Gal10-His_YRT собакоподобных обезьян (0,5 мкг/мл)	
	Величины OD	EC50 нМ)	Величины OD	EC50 (нМ)	Величины OD	EC50 (нМ)
1D11	2,0	0,10	0,05	н.о.	0,03	н.о.
7B07	0,4	0,57	3,22	0,06	0,01	н.о.
8H11	1,5	1,46	3,61	0,03	2,97	0,30
10A06	0,3	0,63	3,69	0,03	3,38	0,06
10B02	1,4	2,28	3,70	0,04	3,36	0,14
10D02	2,7	3,55	3,51	0,14	2,63	неоднозначны е
11F02	0,9	3,08	3,29	0,60	1,70	неоднозначны е
11F12	2,7	4,83	3,69	0,05	3,35	0,21

Были сделаны следующие наблюдения.

Новая панель мышинных антител IgG1 против галектина-10 показала относительную способность связывания в ELISA от 0,57 до 4,83 нМ с галектином-10 человека, от 0,03 до 0,60 нМ с изоформой WGS собакоподобных обезьян и от 0,06 до 0,30 нМ с изоформой YRT собакоподобных обезьян, соответственно.

Клон ID11 показал лучшую относительную способность связывания с человеческим галектином-10 (значение EC50 0,10 нМ), но не с галектином-10 собакоподобных обезьян.

Что касается человеческого галектина-10, то клоны 7B07, 10A06 и 8H11 показали лучшую относительную связывающую способность со значением EC50 от 0,57 нМ до 1,46 нМ. Что касается изоформы WGS галектина-10, то клоны 8H11, 10A06 и 10B02 показали лучше связывание со значениями EC50 от 0,03 нМ до 0,04 нМ, что в 18-53 раза превышало связывание с человеческой мишенью.

И наконец, клоны 10A06, 10B02 и 11F12 показали лучшую относительную способность связываться с изоформой YRT галектина-10-His собакоподобных обезьян со значениями EC50 от 0,06 нМ до 0,21 нМ.

(ii) Анализ ППР.

Способность панели мышинных антител IgG1 связываться с галектином-10 анализировали на Biacore T3000. Для этой цели проводили анализ методом захвата, где фиксированную концентрацию мышинного клона IgG1 (1,5 мкг/мл) захватывали поликлональными антителами против мышинного Fc, иммобилизованными на чипе CM5 для достижения сигнала связывания приблизительно 150 RU. И наконец, вводили серийное разведение изоформы WGS галектина-10-His человека и собакоподобных обезьян (серийное разведение, 1/2 из 5 мкг/мл) в HBS-EP pH 7,4. Необработанные данные анализировали с помощью компьютерной программы для оценки BIA с вычитанием фона. Kd/KD и Rmax каждого mAb против галектина-10-His определяли по кривой зависимости кинетики одновременного связывания при ka/kd/связывания с переносом массы/локального Rmax с помощью компьютерной программы для оценки BIA.

Характеризация связывающих свойств панели мышинных IgG1 с помощью Biacore T3000

Клон (мышинного IgG1)	с человеческим Gal10-His				с Gal10-His_WGS собакоподобных обезьян			
	ka (1/мс) E05	kd (1/с) E-04	Rmax	KD (нМ)	ka (1/мс) E05	kd (1с) E-04	Rmax	KD (нМ)
ID11	127	93,1	68	0,7	н.о	н.о	7	н.о
7B07	27,8	39	65	1,4	454	660	24	1,5
8H11	23,1	19,7	50	0,9	1,7	7,54	30	4,4
10A06	117	101	39	0,9	129	147	21	1,1
10B02	14,2	20,5	37	1,5	4,94	4,2	40	0,9
10D02	5,47	8,65	37	1,6	4,77	9,12	21	1,9
11F02	22,7	48,9	24	2,2	3,94	19,8	17	5,0
11F12	30,4	22,4	37	0,7	4,94	5,94	30	1,2

Были сделаны следующие наблюдения.

В этом эксперименте, 7 перекрестно-реактивных клонов человека и собакоподобных обезьян показали аффинность к галектину-10 (изоформы WGS) человека и собакоподобных обезьян от наномолярного до субнаномолярного диапазона со скоростью диссоциации от  $4,2 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$  до  $660 \times 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ .

Для галектина-10-His человека и собакоподобных обезьян, клоны 8H11, 10A06 и 11 F12 показали наилучшую связывающую способность с аффинностью от 0,7 до 0,9 нМ для человеческой мишени и от 0,9 до 1,2 нМ для антигена собакоподобных обезьян (изоформы WGS).

Клон ID11 оказался одной из лучших молекул по связыванию с галектином-10 человека (аффинность, равная 0,7 нМ), но показал отсутствие/низкое связывание с антигеном собакоподобных обезьян (Rmax, равное 7 RU).

В. Растворение рекомбинантных кристаллов CLC человека *in vitro*.

Растворение CLC, индуцированное клонами мышинного IgG1 против галектина-10, оценивали путем мониторинга с помощью конфокального микроскопа с вращающимся диском. Вкратце, раствор, содержащий человеческие CLC, наносили пятнами на лунки планшета с  $\mu$ -предметными стеклами, а затем инкубировали с фиксированной концентрацией (50 мкМ) мышинных антител IgG1 против галектина-10. И наконец, для каждой лунки были определены положения изображения, и каждое положение отображалось каждые 3-5 мин, в общей сложности, 120 мин. И наконец, с использованием компьютерной программы была определена поверхность, занимаемая CLC, и начальная площадь, покрытая CLC, в начале эксперимента, была определена как 1. В качестве негативного контроля был включен контрольное мышинное антитело изотипа IgG1. Общий размер CLC измеряли в течение определенного периода времени и по этим данным строили график с помощью программы GraphPad Prism 7.01 (см. фиг. 15). Значения EC50 и EC90 для каждого клона мышинного IgG1 вычисляли с помощью нелинейной регрессии ( $\log(\text{агонист})$  по наклону кривой результирующих переменных (четыре параметра)), и эти величины представлены ниже в таблице.

Растворение кристаллов галектина-10 in vitro

Концентрация (мкМ)	Клоны	Формат	50% растворение (мин.)	90% растворение (мин.)
50	1D11	mIgG1	30,1	56,7
	7B07		13,2	44,4
	8H11		22,4	43,5
	10A06		44,5	86,6
	10B02		25,1	47,4
	10D02		26,5	58,6
	11F02		25,5	57,5
	11F12		21,3	42,6

Пример 17. Характеризация антител к галектину-10 в формате Fab.

А. Получение Fab-клонов и данных bELISA.

Для определения точного эпитопа на галектине-10 для семи мышинных антител IgG1 против галектина-10 было начато кристаллографическое исследование. Для этой цели, семь антител против галектина-10, охарактеризованные выше в примере 16, были получены в виде Fab.

Для этого, VH и VL каждого клона амплифицировали с помощью ПЦР с использованием специфических праймеров, очищали путем электрофореза, расщепляли рестриктурирующими ферментами (BsmBi) и лигировали в предварительно расщепленные векторы, содержащие человеческие константные домены: человеческий константный домен лямбда для VL (pUPEX116.9) или константный домен CH1 для VH (pUPEX86, включая часть шарнирной области). Трансформацию каждого из лигированных продуктов в бактерии Top10 осуществляли посредством теплового шока, и клетки переносили на агарозные планшеты с ампициллином (ген резистентности векторов). После инкубирования в течение одной ночи, лигированные продукты показали большое количество моноколоний, тогда как для негативного контроля (пустых векторов) колоний не наблюдалось. Затем отбирали от четырех до восьми колоний, содержащих клоны (VH и VL), и отправляли для секвенирования. Клоны, имеющие правильную вставку, отбирали и амплифицировали для очистки последовательности ДНК (MidiPrep).

Получение семи основных клонов Fab инициировали в клетках млекопитающих. Трансфекцию осуществляли в отношении 1 тяжелой цепи к 3 легким цепям, включенным в клетки HEK293E посредством полиэтиленimina (PEI). После 10-дневного продуцирования, человеческий Fab очищали из клеточного супернатанта с использованием сфер для захвата, содержащих IgG-CH1 и сефарозу. И наконец, был проведен анализ с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ для оценки чистоты и целостности молекул Fab (молекулярная масса ~ 55 кДа).

Связывающую способность основных Fab против галектина-10 тестировали с помощью ELISA на связывание. Вкратце, планшет microplate покрывали в течение ночи 1 мкг/мл человеческого галектина-10-His. Затем серийное разведение каждого клона (от 4 мкМ, разведение 1/4, 12 точек разведения) инкубировали на покрытом галектине-10. После нескольких стадий промывки, детектирование связанного Fab проводили с использованием конъюгированного с пероксидазой Fab-специфичного антитела против человеческого IgG. Поглощение измеряли на 450 нм (эталон на 620 нм) с помощью прибора Tecan. Результаты показаны ниже в таблице.

Таблица 25

## Характеризация связывающих свойств Fab против галектина-10

	bELISA на покрытом галектине-10-His при 1 мкг/мл	
	V <sub>max</sub>	EC50 (нМ)
1D11	1,59	1,4
7B07	0,65	24,4
8H11	0,95	24,3
10A06	0,36	89,5
10B02	0,74	61,2
10D02	1,03	16,1
11F02	0,46	81,4
11F12	1,375	22,4

Данные ELISA на связывание показали, что Fab можно подразделить на 3 группы по их способности связываться с покрытым человеческим галектином-10-His:

Группа 1: клоны 8H11, 10D02 и 11 F12 были обнаружены как лучшие связывающиеся молекулы с наибольшей относительной связывающей способностью (16-24 нМ) и V<sub>max</sub> (значения OD 0,74-1,3).

Группа 2: клон 7B07 показал относительно хорошую связывающую способность со значением EC50, равным 24 нМ, и максимальную связывающую способность, равную OD 0,65, но обнаруживал пологий наклон, что свидетельствует о другом взаимодействии посредством связывания с галектином-10.

Группа 3: менее эффективные связывающиеся клоны с самой низкой относительной связывающей способностью (61-90 нМ) и V<sub>max</sub> (значения OD 0,36-0,74), включающие клоны 10B02, 10A06 и 11F02.

При относительной связывающей способности, равной 1,4 нМ, клон 1D11 показал лучшую способность связывания с человеческим галектином-10, что полностью соответствует данным по mAb.

В. Кристаллическая структура Fab-фрагментов против галектина-10 в комплексе с галектином-10.

Кристаллическая структура различных Fab-фрагментов в комплексе с галектином-10 была получена как описано в примере 12. Результаты показаны на фиг. 16. Эти структуры показали, что клоны 8H11, 1D11, 4E8, 6F5, 10D2 и 11F12 связываются с тирозином 69 (Y69) или с эпитопом в непосредственной близости от Y69, тогда как 7B7 связывается с противоположной стороной димера галектина-10.

Остатки галектина-10, участвующие в связывании Fab-фрагментов против галектина-10 с димером галектина-10, показаны ниже в табл. 26.

Таблица 26

Остатки галектина-10, которые непосредственно взаимодействуют с CDR Fab против галектина-10

Клон	Остатки галектина-10, взаимодействующие	
	с VH	с VL
1D11	42, 49, 68, 69, 73, 115-117, 119-120	69, 70, 71 и 73
6F5	43, 49, 68, 69, 114-117, 119-120	73, 98, 113-115 и 117
4E8	74, 113-115	49, 68, 69,73, 98, 115-117
8H11	33, 59, 60, 78-82 и 109	60, 74, 75, 77 и 79
11F12	33, 59, 60, 72, 79-82, 84 и 109	74, 75, 76, 77 и 79
10B02	33, 59, 60, 77-84	74, 75, 76, 77 и 79
10D02	31, 33, 59, 60, 78-82 и 84	79
7B7	2-5, 7-11, 25, 44, 88, 123, 125, 133 и 135	2, 23, 25, 86-90, 105 и 134

Остатки CDR Fab против галектина-10, участвующие в связывании с димером галектина-10, показаны ниже в табл. 27.

Таблица 27

Остатки CDR Fab, которые контактируют с остатками димера галектина-10 в кристаллической структуре

Клон		Остатки CDR Fab1	Остатки галектина-10 (Мономер А)	Остатки CDR Fab2	Остатки галектина-10 (Мономер В)
<b>1D1 1</b>	<b>VH</b>	CDR1-31 CDR2-53 CDR3-102-107	42, 49, 68, 69, 73, 115-117, 119-120	CDR1-31 CDR2-53 CDR3-102-107	42, 49, 68, 69, 73, 115-117, 119-120
	<b>VL</b>	CDR1-31 и 34 CDR3-93 и 97	69, 70, 71, 73	CDR1-31 и 34 CDR3-93, 96 и 97	69, 70, 71, 73
<b>6F5</b>	<b>VH</b>	CDR1-2, 27, 31 и 32 CDR3-98, 99, 102-105, 107, 110	43, 49, 68, 69, 114-117, 119- 120	CDR1-2, 27, 31 и 32 CDR3-98, 99, 102- 105, 107, 110	43, 49, 68, 69, 114- 117, 119-120

	<b>VL</b>	CDR1-33 и 34 CDR2-51, 52, 55 и 58	73, 98, 113-115 и 117	CDR1-33 и 34 CDR2-51, 52, 55 и 58	73, 98, 113-115 и 117
<b>4E8</b>	<b>VH</b>	CDR2-60 CDR3-105, 107 и 109	74, 113-115	CDR2-60 CDR3-104, 105, 107 и 109	74, 113-115
	<b>VL</b>	CDR1-26, 28-31 CDR2-49 CDR3-91-94	49, 68, 69, 73, 98, 115-117	CDR1-26, 28-31 CDR3-91-94	49, 68, 69, 73, 98, 115-117
<b>7B0</b> 7	<b>VH</b>	CDR1-30 и 31 CDR2-53-57 CDR3-100, 102- 105	2, 3, 25, 88 и 133	CDR1-30 и 31 CDR2-53-57 CDR3-100, 102-104	4, 5, 7-11, 44, 123, 125, 135
	<b>VL</b>	CDR1-26, 28-31 CDR2-48, 50, 51 CDR3-65, 91-93	2, 23, 25, 86- 90, 105 и 134	CDR1-26, 28-31 CDR2-48, 50, 51 CDR3-65, 91-93	2, 23, 25, 86-90, 105, 134
<b>8H1</b> 1	<b>VH</b>	CDR1-31-33 CDR2-52-54, 56, 57 и 59 CDR3-99-101	33, 59, 60, 78- 82 и 109	CDR1-30-33 CDR2-52-54, 56, 57 и 59 CDR3-100 и 101	33, 59, 60, 78-82 и 109
	<b>VL</b>	CDR1-31, 32 и 34 CDR3-93 и 97	60, 74, 75, 77 и 79	CDR1-31, 32 и 34 CDR3-93 и 97	60, 74, 75, 77 и 79
<b>11F</b> 12	<b>VH</b>	CDR1-30-33 CDR2-52-54, 56 и 57 CDR3-99-101	33, 59, 60, 72, 79-82, 84 и 109	CDR1-30-33 CDR2-52-54, 57 CDR3-99-101	33, 59, 60, 78-82 и 109
	<b>VL</b>	CDR1 32 и 34 CDR3 97	74, 75, 76, 77 и 79	CDR1-32 и 34 CDR3-97	74, 75, 77 и 79,
<b>10B</b> 02	<b>VH</b>	CDR1-31-33 CDR2-52-54, 56, 57 и 59 CDR3-99-102	33, 59, 60, 70, 72, 77-82, 84	CDR1-31 и 33 CDR2-53-54, 56, 57 и 59 CDR3-99-102	33, 59, 60, 70, 72, 77-82, 84
	<b>VL</b>	CDR1-31, 32 и	74, 75, 76, 77 и	CDR1 -30, 31, 32 и	74, 75, 76, 77 и 79
		34 CDR3-93 и 97	79	34 CDR3-93 и 97	
<b>10D</b> 02	<b>VH</b>	CDR1-28, 30-33 CDR2-53-57 CDR3-99-101	31, 33, 59, 60, 70, 72, 78-82, 84,	CDR1-28, 30-33 CDR2-52-54, 56 и 57 CDR3-99-103	31, 33, 59, 60, 70, 72, 78-82, 84,
	<b>VL</b>	CDR3-97	79	CDR3-97	2, 79

Пример 18. Сравнение растворения CLC под действием mAb и Fab-фрагментов против галектина-10.

Способность Fab против галектина-10 солюбилизовать уже существующие кристаллы рекомбинантного человеческого галектина-10 *in vitro* сравнивали с mAb против галектина-10. Протокол описан выше в примере 16.

Результаты показаны на фиг. 17, а также ниже в таблице. В некоторых случаях, Fab-фрагменты были более эффективными при растворении CLC, чем соответствующие mAb.

Таблица 28

Растворение CLC, опосредованное mAb и Fab против галектина-10

Концентрация (мкМ)	Клоны	Формат	50% растворение кристаллов (мин)	90% растворение кристаллов (мин)
50	7B07	mIgG1	31,76	93,02
	8H11		68,29	>120
	10A06		>120	>120
	10B02		73,66	>120
	11F12		65,43	>120
	1D11		100	>120
50	7B07	hFab	15,09	54,14
	8H11		48,53	>120
	10A06		49,15	>120
	10B02		102,2	>120
	10D02		59,67	>120
	11F02		77,86	>120
	11F12		61,96	>120
	1D11		33,42	97,85

Пример 19. Производство антител с VHH, которые связываются с галектином-10.

Двух лам иммунизировали рекомбинантным человеческим галектином-10. Информационную РНК (мРНК) очищали из МКПК, выделенных из крови иммунизованных лам. мРНК подвергали обратной транскрипции с использованием рандомизированных гексамерных праймеров для получения кДНК. Меченые праймеры использовали непосредственно на кДНК для ПЦР-амплификации области VHH. Затем ПЦР-продукт очищали, расщепляли и клонировали в фагидном векторе (с меткой VHH-Мус-His) для создания библиотеки VHH.

Для отбора клонов VHH с подходящей способностью связывания с галектином-10 человека и собакоподобных обезьян применяли метод биопэннинга. С этой целью был проведен первый раунд отбора против человеческого галектина-10-His, а затем второй раунд обогащения против изоформ WGS или YRT человека или собакоподобных обезьян (His-меченных). Вкратце, галектин-10-His человека или собакоподобных обезьян (изоформа WGS или YRT) иммобилизовали на планшете Maxisorp для ELISA, а затем добавляли библиотеку фагов VHH (исходную). Несвязанные фаги удаляли путем проведения нескольких стадий промывки. И наконец, было проведено E.coli-инфицирование для амплификации выбранных фагов. Этот процесс привел к обогащению популяции фагов, экспрессирующих VHH с высокой аффинностью к галектину-10 человека и собакоподобных обезьян.

Из элюированных фагов в раунде 2 были получены отдельные клоны против изоформы WGS человека и собакоподобных обезьян и изоформы YRT галектина-10 собакоподобных обезьян в концентрации 0,5 и 0,05 мкг/мл. Периплазматические экстракты, содержащие клон VHH против галектина-10 человека и собакоподобных обезьян, скринировали на связывающую способность с помощью ELISA и биослойной интерферометрии (BLI).

Способность VHH (периплазматического экстракта) связываться с галектином-10 человека и собакоподобных обезьян (изоформ WGS и YRT) анализировали с помощью ELISA. Вкратце, планшет maxisorp покрывали в течение ночи 1 мкг/мл человеческого галектин-10-His или изоформами WGS или YRT галектина-10-His собакоподобных обезьян, а затем блокировали PBS с 1% казеином, после чего инкубировали с периплазматическим экстрактом (разведение 1/5 в PBS с 0,1% казеином), содержащим меченый VHH-Мус. Детектирование связывающих молекул проводили с использованием ПХ-конъюгированного антитела против Мус (Bethyl, каталог A190-105P). Затем добавляли субстрат ТМВ, и реакцию останавливали путем добавления 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Поглощение измеряли на 450 нм (эталон на 620 нм) с помощью прибора Тесап. И наконец, исходные данные (значения OD) были нанесены на график с использованием программы GraphPad Prism 7.01 и представлены на фиг. 18. Было определено количество связывающих молекул по значениям OD выше 0,5, на один планшет MP. Были включены пустой контроль и негативный контроль (связывание периплазматического экстракта VHH с нерелевантной мишенью), которые, как и ожидалось, не обнаруживали связывания.

Таблица 29

Характеризация периплазматических экстрактов VHH с помощью ELISA-скрининга

Номер MP	Антиген	Мишени	% мишеней
MP13	Человеческий Gal10HIS	51	53,1
	Gal10HIS_WGS собакоподобных обезьян	57	59,4
	Gal10HIS_YRT собакоподобных обезьян	67	69,8
MP14	Человеческий Gal10HIS	14	14,6
	Gal10HIS_WGS собакоподобных обезьян	13	13,5
	Gal10HIS_YRT собакоподобных обезьян	34	35,4

Для скрининга на клоны, связывающиеся с галектином-10, помимо ELISA на связывание, проводили BLI.

Из двух планшетов Master, приготовленных во время отбора, было отобрано 130 клонов, которые продемонстрировали связывание клонов человека и собакоподобных обезьян во время экспериментов по ELISA-скринингу, и их способность связываться тестировали с помощью BLI с использованием Octet RED96. Вкратце, изоформы меченного галектина-10-His WGS или YRT человека и собакоподобных обезьян разводили в кинетическом буфере (PBS: 0,01% BSA и 0,002% Твина 20) при 200 мкг/мл, с последующим захватом наконечниками датчика с антителом против Penta His 1K (ForteBio, № по каталогу 18-5120) до достижения уровня иммобилизации 1 нм. Затем наносили разведенные периплазматические экстракты (1/5 в кинетическом буфере), содержащие клоны VHH, и измеряли степень ассоциации/диссоциации с иммобилизованным галектином-10-His с использованием компьютерной программы для анализа данных ForteBio 9.0 (с вычитанием контрольных наконечников (загруженных до 1 нм нерелевантным His-меченым белком, модель связывания 1.1). Во время скрининга можно было определить только диссоциацию (скорость диссоциации) VHH, поскольку эффективная концентрация VHH была неизвестна и могла сильно варьироваться от клона к клону. Результаты, показанные на фиг. 19, подтверждают, что большинство выбранных клонов VHH обладали перекрестной реактивностью с антигенами человека и собакоподобных обезьян.

Отобранные клоны VHH, которые показали связывание с галектином-10, были отправлены для секвенирования. Исходя из последовательностей CDR1-2-3 VHH, каждый клон был отнесен к определенному семейству. В результате этого было определено 44 семейства. Исходя из данных скрининга на связывание (ELISA и BLI) и их последовательностей было отобрано 15 клонов VHH для дальнейшей характеристики. Получение очищенных VHH было начато в E.coli. Для этой цели выбранные VHH сначала культивировали в среде 2TY с низким содержанием глюкозы, и продуцирование VHH индуцировали посредством инкубирования в течение ночи с IPTG (1 мМ). На следующий день, гранулы бактерий лизировали двумя циклами замораживания/оттаивания (при -80 и -20°C). После центрифугирования, меченые VHH-His очищали из клеточного супернатанта с использованием аффинной к металлу смолы Talon (BD Catalog 635504). И наконец, был проведен анализ с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ для оценки чистоты и целостности молекул VHH (молекулярная масса ~ 15 кДа).

Последовательности доменов CDR и VHH 15 клонов, выбранных для дальнейшей характеристики, показаны в табл. 35 и 36 ниже.

Пример 20. Характеризация антител к VHH, связывающихся с галектином-10.

А. Связывание клонов VHH с галектином-10, оцененное с помощью ELISA.

Связывающую способность 15 клонов с VHH анализировали с помощью ELISA. Вкратце, планшет maxisorp покрывали в течение ночи изоформами WGS или YRT галектина-10-His человека или собакоподобных обезьян в концентрации 1 пг/мл и блокировали PBS с 1% казеином, а затем инкубировали с серийным разведением VHH (от 4 мкМ, разведение 1/3, 12 точек разведения). После нескольких стадий промывки, детектирование связанного VHH проводили с использованием ПХ-конъюгированного антитела против Мус (Bethyl, каталог A190-105P). Поглощение измеряли на 450 нм (эталон на 620 нм) с помощью прибора Tecan. И наконец, необработанные данные (значения OD) были отложены на графике с использованием программы GraphPad Prism 7.01. Значения EC50 для каждого соединения вычисляли с помощью нелинейной регрессии (log(агонист) по наклону кривой результирующих переменных (четыре параметра)), и эти величины представлены в таблице. В качестве позитивного контроля был включен клон 1D06 из предыдущей панели, специфичной для человека. Результаты показаны ниже в таблице.

Характеризация клонов VHH против галектина-10 с помощью ELISA

ELISA VHH на покрытом Gal10-HIS при 1 мкг/мл						
Клоны (VHH)	Человеческие		WGS собакоподобных обезьян		YRT собакоподобных обезьян	
	Vmax (величины OD)	EC50 (нМ)	Vmax (величины OD)	EC50 (нМ)	Vmax (величины OD)	EC50 (нМ)
13A05	1,8	69,7	2,7	77,8	2,9	66,3
13B06	1,0	неоднозначные	1,4	Неоднозначные	2,0	неоднозначные
13C03	2,0	30,6	0,1	/	0,1	/
13C04	1,1	неоднозначные	2,7	369,1	2,5	неоднозначные
13C06	2,8	27,5	2,9	10,3	2,9	16,2
13C07	1,3	106,7	2,9	7,1	2,8	33,2
13C10	1,0	неоднозначные	2,3	Неоднозначные	2,7	185,8
13D12	0,8	неоднозначные	1,3	Неоднозначные	2,4	118,9
13E07	1,1	неоднозначные	2,3	371,0	2,4	неоднозначные
						ые
13E09	1,8	105,7	2,3	438,4	3,0	66,9
13G12	1,6	141,0	2,9	11,8	3,1	3,1
13H07	1,5	179,9	2,7	15,6	3,1	1,3
14E02	0,7	неоднозначные	1,8	Неоднозначные	2,1	неоднозначные
14E10	0,5	неоднозначные	1,4	Неоднозначные	2,7	15,8
14F10	0,5	неоднозначные	2,6	60,4	3,0	3,0
1D06	1,2	90,7	0,0	/	0,0	/

Были сделаны следующие наблюдения.

Клоны 13C06 и 13A05 представляли собой лучшие перекрестно-реактивные связывающие молекулы для человека и собакоподобных обезьян, где относительная связывающая способность имела величины EC50 21-69,7 нМ для человеческого галектина-10 и величины EC50 10,3-77,8 нМ для изоформы WGS и значения EC50 16,2-66,3 нМ для изоформы YRT галектина-10 собакоподобных обезьян.

Клоны 13C07, 13E09, 13G12 и 13H07 продемонстрировали умеренную способность связываться с человеческим галектином-10 при величинах EC50 от 105 до 180 нМ, и сильную способность связываться с галектином-10 собакоподобных обезьян при величинах EC50 от 7,1 до 438 нМ для изоформы WGS и от 1,3 до 33 нМ для изоформы YRT.

Клон 13C03 продемонстрировал сильное связывание с человеческим галектином-10 с относительной связывающей способностью, равной 30 нМ, но слабое связывание с изоформами собакоподобных обезьян (значение OD Vmax 0,1).

Клон 1D06, выделенный из предыдущей библиотеки scFv, отобранной исключительно против галектина-10 человека, показал значение EC50, равное 90 нМ, но не обнаружил перекрестной реактивности для собакоподобных обезьян.

В. Клоны VHH растворяют рекомбинантные человеческие CLC in vitro.

Растворение CLC, индуцированное клоном VHH 1D06, оценивали путем мониторинга с помощью конфокального микроскопа с вращающимся диском. Вкратце, раствор, содержащий человеческие CLC, наносили пятнами на лунки планшета с  $\mu$ -предметными стеклами, а затем инкубировали с фиксированной концентрацией (50 мкМ или 100 мкМ) антитела с VHH 1D06. И наконец, для каждой лунки были определены положения изображения, и каждое положение отображалось каждые 3-5 мин, в общей сложности, 120 мин. И наконец, с использованием компьютерной программы была определена поверхность,

занимаемая CLC, и начальная площадь, покрытая CLC, в начале эксперимента, была определена как 1. В качестве негативного контроля был включен VHH контрольного изотипа. Общий размер CLC измеряли в течение определенного периода времени и по этим данным строили график с помощью программы GraphPad Prism 7.01 (см. фиг. 20). Значения EC50 и EC90 для клона VHH вычисляли с помощью нелинейной регрессии (log(агонист) по наклону кривой результирующих переменных (четыре параметра)), и эти величины представлены ниже в таблице.

Таблица 31

## Растворение CLC клоном VHH 1D06

Концентрация (мкМ)	Клоны	Формат	50% растворение (мин.)	90% растворение (мин.)
50	1D06	VHH	20,1	13,6
100			7,2	43,96

Таблица 32

## Последовательности CDR тяжелой цепи антител scFv, связывающихся с галектином-10

Клон scFv	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
7B07	SYDMS	160	AIKNGGGITYYADSVKG	161	THGIGTLGFGS	162
8H11	TNYMN	163	GITSGGGRTYYADSVKG	164	TDHAWLDA	165
10A06	NYDMS	166	DINSGGGSTYYADSVKG	167	GYTGYYY	168
10B02	YHYMN	169	GISAGGGRTYYADSVKG	170	VHGITNDY	171
10D02	SYYMS	172	GIVTGGGRTHYTDSVKG	173	VNGVVNTYDY	174
11F02	TNYMN	163	GITSHGARTYYADSVKG	175	TDHASLDA	176
11F12	TNYMN	163	GITSGGGRTYYADSVKG	164	TDHAWLDA	165

Таблица 33

## Последовательности CDR легкой цепи антител scFv, связывающихся с галектином-10

Клон scFv	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
7B07	DGNNIGSKSAQ	177	ADEYRPE	178	QVWDGSAAV	179
8H11	AGTSSDVGYGNYVS	180	AVSTRAS	181	ASYRSSNNYV	182
10A06	GLSSGSVTSSNYPA	183	SINSRHS	184	TLYMGTSNNVV	185
10B02	AGTSSDVGYGNYVS	180	EVNKRAS	186	ASYRNSNNWV	187
10D02	AGTSSDVGYGNYVS	180	DVNKRAS	188	ASYRSPNNVV	189
11F02	GLSSGSVTSSNYPG	190	NTNSRYS	191	ALYMGSSSYNTV	192
11F12	AGTSSDVGYGNYVS	180	AVSTRAS	181	ASYSVRNNVV	193

Таблица 34

## Последовательности VH и VL антител scFv, связывающихся с галектином-10

Клон scFv	VH	SEQ ID NO.	VL	SEQ ID NO.
7B07	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRS	194	SYELTQSASVSVALTQTAKITCDGNNIGSKSAQWYQ	195

	YDMSWVRQAPGKGP EWVSAIKNGGGITYYA DSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSKPEDTA VYYCATTHGIGTLGFGSWGQGTQVTVSS		QKPGQAPALVIY ADEYRPEGIPERFSGSNSGNTATLII SGAQAEDEADYYCQVWDGSAAVFGRGHTLTVL	
8H11	ELQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTN YMNWVRQAPGKGLEWVSGITSGGRTYYAD SVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSKPEDTAL YYCARTDHAWLDAWGQGLTVTVSS	196	QAGLTQPPSVSGTLGKTVTISCAGTSSDVGYGNYVS WYQQLPGTAPKLLIYAVSTRASGIPDRFSGSKSGNT ASLTISGLLSEDEADYYCASYRSSNNYVFGGGTKLT VL	197
10A06	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGN YDMSWVRQAPGKGP EWVSDINSGGGSTYYA DSVKGRFTISRDNANKNLLQMNLSKPEDTA VYYCATGYTGYYYWGQGTQVTVSS	198	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSNYP WYQQTGQAPRALIYSINRHSVDPDRFSGSISGNK AALTITGAQAEDEADYYCTLYMGTGSNNVFGGGT HLTVL	199
10B02	QVQLVESGGGLVQPGGSLRVCAASGFTFSY HYMNWVRQAPGKGLEWVSGISAGGRTYY ADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSNAEDT ALYYCARVHGITNDYWGQGTQVTVSS	200	QSALTQPPSVSGSPGKTVTISCAGTSSDVGYGNYVS WYQQLPGMAPKLLIYEVNKRASGITDRFSGSKSGNT AFLTISGLQSEDEADYYCASYRNSNNVFGGGTHL TVL	201
10D02	EVQLVESGGGLVQPGGSLRVCAASGFTFSSY YMSWVRQAPGKGLEWVSGIVTGGRTHTYTD SVKGRFTITRDNANTLYLQMNLSRPEDTAL YYCARVNGVVTNYDYWGQGTQVTVSS	202	QAVLTQPPSVSGSPGKTVTISCAGTSSDVGYGNYVS WYQQLPGMAPKLLIYDVNKRASGITDRFSGSKSGN TASLTISGLQSEDEADYFCASYRSPNNVFGGGTHL TVL	203
11F02	ELQVYESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTN YMNWVRQAPGKGLEWVSGITSHGARTYYAD SVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSKPEDTALY YCARTDHASLDAWGQGLTVTVSS	204	QTVVTQEPSLSVSPGGTVTLTCGLSSGSVTSNYPG WYQKPGQAPRLLIYNTNSRYSGVPRFSGSISGNK AALTITGAQPEDEADYYCALYMGSSSYNTVFGGGT HLTVL	205
11F12	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTN YMNWVRQAPGKGLEWVSGITSGGRTYYAD SVKGRFTISRDNANTLYLQMNLSKPEDTAL YYCARTDHAWLDAWGQGLTVTVSS	206	HSAVTQPPSVSGTLGKTVTISCAGTSSDVGYGNYVS WYQHLPGTAPKLLIYAVSTRASGVPDRFSGSKSGNT ASLTISGLQSEDEGDYYCASYSVRNNVFGGGTRLT VL	207

Таблица 35

## Последовательности CDR антител VHH, связывающихся с галектином-10

Клон VHH	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
13G12	AYSMG	208	VISWSGGSHYDDSVKG	209	GTLYSFRYRDYDY	210
13H07	TYAMD	211	AISWHSAIYYADAVKG	212	ALRYRFNPSAMEY	213
14F10	GYAVG	214	IISWNGGTHYADSVKG	215	SPKYYFSPETYNY	216
13C06	SYSMG	217	TISWSGGFYDDSVKG	218	GTRFSFSYREYHY	219
13C07	AYSMA	220	AITWSGGSHHDDSVKG	221	GTLYSFSYRDYDY	222
14E10	PYAMG	223	VISLSGAYTYNVNAVKG	224	SRTYYRTDESTYEY	225
13D12	SYHMM	226	ALAWRGGTYCANSVKG	227	SRRYVFDPSAMDY	228
13A05	SYSMS	229	IISWSGGTYDDSVKG	230	GTQFSFSYREYDY	231
13C04	TYSMA	232	AITRSGGNTYADSVKG	233	GGTYSFVPRSYNY	234
13E09	SYHMM	226	AIAWRGGTYCANSVKG	235	SLRYVFDPSAMDY	236
14E02	TYSMA	232	AITWAGGYTYGADSEKG	237	GRLFTSQSSAYQY	238
13C10	PYTMG	239	VVSSGGGTYANSVKG	240	GSIFRWSPMSYDY	241
13E07	SYHMM	226	AIAWRGGTYCANSVKG	235	SLRYVFDPSAMDY	236
13C03	ISRMG	242	IIFSDASTDYADSVKG	243	VLRAAGYGFYFNQY	244
13B06	TYSMA	232	AITRSGGNTYADSVKG	233	GGTYSFVPRSYNY	234
1D6	TYAMG	245	AITRAGGNTYNADSVKG	246	GPRYSTISTMFPY	247
15A2	SYSMG	217	TISWSGGNYVDNSVKG	248	GTQFSFSYRQYDY	249

Последовательности домена VHH антител с VHH, связывающихся с галектином-10

Клон	Последовательность VHH	SEQ ID NO.
13G12	QLQVVEGGGLVQAGGSLRLSCAASSSAYSMGWFRQAPGKEREVAVISWGGSHYDDSVKGRFTISR DGA KNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAVGTLYSFRYRDYDYGQGTQVTVSS	250
13H07	QLQVVEGGGLVQAGGSLRLSCLVSGRTFSTYAMDWFRQAPGKEREVAAISWHSIAIYYADAVKGRFTISR DNGKNTMYLQMNLSKPEDTAVYFCAAALRYRFPNSAMEYWGKGLTVTVSS	251
14F10	EVQLVEGGGLVQAGDLSRLSCLVSGRTFSGYAVGWFRQAPGKEREVTVIISWNGGTHYADSVKGRFAISR DNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAVSPKYYFSPETYNWYGQGTQVTVSS	252
13C06	QLQVVEGGGLVQAGGSLRLSCLVSGRTFSGYAVGWFRQAPGKEREVATISWGGFYDDSVKGRFTVSRDNA KNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAAGTRFYSYREYHYWGQGTQVTVSS	253
13C07	QLQVVEGGGLVQAGGSLRLSCLVSGRTFSGYAVGWFRQAPGKEREVAAITWGGSHHDDSVKGRFTISR DGA KNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAVGTLYSFRYRDYDYGQGTQVTVSS	254
14E10	ELQVVEGGGLVQAGGSLRLSCLVSGRTFTRPYAMGWFRQAPRKEREVAVISLSGAYTYNVNAVKGRFTISR RDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAGASRTYRTEDESTYEWGQGTQVTVSS	255
13D12	QLQVVEGGGLVQAGDLSRLSCLVSGRTFSSYHMMWFRQAPGKEREVAAALAWRGGTYCANSVKGRCTISR RDNAQDVTYVYLQMNLSKPEDTAVYFCAAARRYVFDPSAMDYWAKGLTVTVSS	256
13A05	QVQLVEGGGLVQAGGSLRLSCLVSGRTFSSYHMMWFRQAPGKEREVAAIISWGGTYDDSVKGRFTVSRDNA KNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAAGTQFSYREYDYGQGTQVTVSS	257
13C04	ELQVVEGGGLVQAGGSLRLSCLVSGRTFSTYSMAWFRQAPGKEREVAAITRSGGNTYADSVKGRFTISR D NAKNTVTLQMNLSKPEDTAAHYCAAGGTYSFVPRSYNYWGQGTQVTVSS	258
13E09	QVQVQESGGGLVQAGNSRLSCLVSGRTFSSYHMMWFRQAPGKEREVAAIAWRGGTYCANSVKGRCTISR RDNAKDTVYLQMNLSKPEDTAVYFCAAASLRVYFDPSAMDYWGKGLTVTVSS	259
14E02	QVQLVEGGGLVQAGGSLRLSCLVSGRTFSTYSMAWFRQAPGKEREVAAITWAGGYTYGADSEKGRFTISR SRDNAKNTVYLQMNLSKPEDTAVYSCAGGRLFTSQSSAYQYWGQGTQVTVSS	260
13C10	QLQVVEGGGLVQAGGSLRLSCLVSGRTFNPYTMGWFRQAPGKEREVAVVSSGGGTYANSVKGRFTISR DNAKATVYLQMNLSKPEDTAVYYCAAGSIFRWSMPSYDYGQGTQVTVSS	261
13E07	ELQVVEGGGLVQAGDLSRLSCLVSGRTFSSYHMMWFRQAPGKEREVAAIAWRGGTYCANSVKGRCTISR RDNAKDTVYLQMNLSKPEDTAVYFCAAASLRVYFDPSAMDYWGKGLTVTVSS	262
13C03	QVQLVEGGGLVQPGGSLRLSCLVSGRTFSSYHMMWFRQAPGKQRELVAIIFSDASTDYADSVKGRFTISR SN AKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCKSVLRAAGYGFYNYWGQGTQVTVSS	263
13B06	QVQLVEGGGLVQAGGSLRLSCLVSGRTFSTYSMAWFRQAPGKEREVAAITRSGGNTYADSVKGRFTISR DNAKNTVTLQMNLSKPEDTAAHYCAAGGTYSFVPRSYNYWGQGTQVTVSS	264
1D6	QLQVVEGGGLVQPGGSLRLSCLVSGRTFSTYSMAWFRQAPGKEREVAAITRAGGNTYNADSVKGRFTISR RDNAENTYVYLQMNLSKPEDTAVYSCAAGPRYSTISTMFPYWGQGTQVTVSS	265
15A2	QVQLVEGGGLVQAGGSLRLSCLVSGRTFSSYHMMWFRQAPGKEREVATISWGGNYVDNSVKGRFTVSRDN AKNTVYLQMNLSKPEDTAVYYCAAGTQFSYRQYDYGQGTQVTVSS	266

Объем настоящего изобретения не ограничивается описанными здесь конкретными вариантами его осуществления. Действительно, помимо описанных здесь модификаций, в настоящее изобретение могут быть внесены различные модификации, которые будут очевидны для специалистов в данной области из предшествующего описания и прилагаемых чертежей. При этом, предполагается, что такие модификации будут входить в объем прилагаемой формулы изобретения. Кроме того, все описанные здесь варианты осуществления рассматриваются как широко применимые и совместимые с любыми и всеми другими рассматриваемыми здесь вариантами осуществления изобретения в зависимости от конкретной ситуации.

Включение посредством ссылки.

Различные публикации цитируются в предшествующем описании и во всех последующих примерах, каждая из которых включена в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения индивидуума, страдающего заболеванием или состоянием, связанным с наличием или образованием кристаллов галектина-10,

где способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с галектином-10, где

(i) антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом галектина-10, содержащим или состоящим из Ser2, Leu3, Leu4, Pro5, Pro7, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Lys23, Arg25, Met44, Gly86, Gln87, Glu88, Phe89, Glu90, Asn105, Gln125, Thr133, Lys134 и Phe135, где остатки идентифицированы со ссылкой на SEQ ID NO:141, и тем самым экранирует пограничный слой упаковки кристаллов галектина-

10;

(ii) антитело или антигенсвязывающий фрагмент при связывании с кристаллическим галектином-10 способствует растворению кристаллического галектина-10.

2. Способ по п.1, где заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из: астмы; хронического риносинусита; глютенной болезни; гельминтной инфекции; эозинофильного воспаления желудочно-кишечного тракта; кистозного фиброза (CF); аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АВРА); васкулита Черга-Штрауса; хронической эозинофильной пневмонии; и острого миелоидного лейкоза.

3. Способ по п.1, где заболевание представляет собой астму.

4. Способ по любому из пп.1-3, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с галектином-10 человека.

5. Способ по любому из пп.1-4, где антитело представляет собой гуманизированный или зародышевый вариант антитела, которое не является антителом человека.

6. Способ по п.5, где антитело, которое не является антителом человека, происходит от верблюдовых.

7. Способ по любому из пп.1-6, где антитело содержит домен СН1, шарнирную область, домен СН2 и/или домен СН3 IgG человека.

8. Способ по п.7, где IgG человека представляет собой IgG1.

9. Способ по любому из пп.1-8, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из переменного домена легкой цепи (VL) антитела; переменного домена тяжелой цепи антитела (VH или VHH); одноцепочечного антитела (scFv); фрагмента F(ab')<sub>2</sub>; фрагмента Fab; фрагмента Fd; фрагмента Fv; одноцепочечного (одновалентного) антитела; диантител, триантител, тетраантител или любой антигенсвязывающей молекулы, образованной комбинацией, сборкой или конъюгированием таких антигенсвязывающих фрагментов.

10. Способ по любому из пп.1-9, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где домены VH и VL содержат последовательности CDR, выбранные из группы, состоящей из:

HCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 162;

HCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 161;

HCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 160;

LCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 179;

LCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 178;

LCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 177.

11. Способ по любому из пп.1-9, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит комбинацию переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL), выбранных из следующего:

VH, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и

VL, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 195 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%.

12. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента, которое связывается с галектином-10 для получения лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, связанного с наличием или образованием кристаллов галектина-10, где:

(i) антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом галектина-10, содержащим или состоящим из Ser2, Leu3, Leu4, Pro5, Pro7, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Lys23, Arg25, Met44, Gly86, Gln87, Glu88, Phe89, Glu90, Asn105, Gln125, Thr133, Lys134 и Phe135, где остатки идентифицированы со ссылкой на SEQ ID NO:141 и тем самым экранирует пограничный слой упаковки кристаллов галектина-10;

(ii) антитело или антигенсвязывающий фрагмент при связывании с кристаллическим галектином-10 способствует растворению кристаллического галектина-10.

13. Применение по п.12, где заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из: астмы; хронического риносинусита; глютенной болезни; гельминтной инфекции; эозинофильного воспаления желудочно-кишечного тракта; кистозного фиброза (CF); аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АВРА); васкулита Черга-Штрауса; хронической эозинофильной пневмонии; и острого миелоидного лейкоза.

14. Применение по п.12, где заболевание представляет собой астму.

15. Применение по любому из пп.12-14, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с галектином-10 человека.

16. Применение по любому из пп.12-15, где антитело представляет собой гуманизированный или зародышевый вариант антитела, которое не является антителом человека.

17. Применение по п.16, где антитело, которое не является антителом человека, происходит от верблюдовых.

18. Применение по любому из пп.12-17, где антитело содержит домен СН1, шарнирную область,

домен CH2 и/или домен CH3 IgG человека.

19. Применение по п.18, где IgG человека представляет собой IgG1.

20. Применение по любому из пп.12-19, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из переменного домена легкой цепи (VL) антитела; переменного домена тяжелой цепи антитела (VH или VHH); одноцепочечного антитела (scFv); фрагмента F(ab')<sub>2</sub>; фрагмента Fab; фрагмента Fd; фрагмента Fv; одноцепочечного (одновалентного) антитела; диантител, триантител, тетраантител или любой антигенсвязывающей молекулы, образованной комбинацией, сборкой или конъюгированием таких антигенсвязывающих фрагментов.

21. Применение по любому из пп.12-20, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где домены VH и VL содержат последовательности CDR, выбранные из группы, состоящей из:

HCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 162;

HCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 161;

HCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 160;

LCDR3, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 179;

LCDR2, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 178;

LCDR1, содержащей или состоящей из SEQ ID NO: 177.

22. Применение по любому из пп.12-20, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит комбинацию переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL), выбранных из следующего:

VH, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194 или аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%, и

VL, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 195 или

аминокислотную последовательность, идентичную ей по меньшей мере на 90, 95, 97, 98 или 99%.

23. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с галектином-10, где:

(i) антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом галектина-10, содержащим или состоящим из Ser2, Leu3, Leu4, Pro5, Pro7, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Lys23, Arg25, Met44, Gly86, Gln87, Glu88, Phe89, Glu90, Asn105, Gln125, Thr133, Lys134 и Phe135, где остатки идентифицированы со ссылкой на SEQ ID NO: 141; и

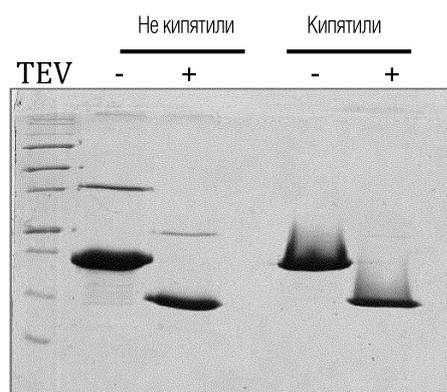
(ii) антитело или антигенсвязывающий фрагмент при связывании с кристаллическим галектином-10 способствует растворению кристаллического галектина-10.

24. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент, где:

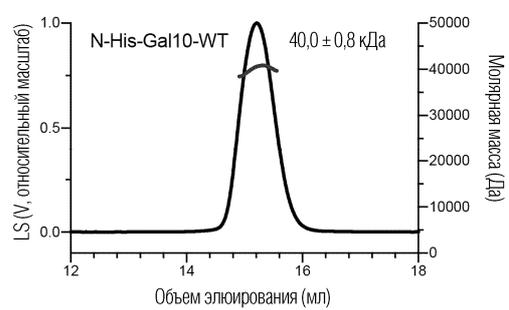
(i) антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом галектина-10, содержащим или состоящим из Ser2, Leu3, Leu4, Pro5, Pro7, Tyr8, Thr9, Glu10, Ala11, Lys23, Arg25, Met44, Gly86, Gln87, Glu88, Phe89, Glu90, Asn105, Gln125, Thr133, Lys134 и Phe135, где остатки идентифицированы со ссылкой на SEQ ID NO: 141; и

(ii) антитело или антигенсвязывающий фрагмент при связывании с кристаллическим галектином-10 способствует растворению кристаллического галектина-10.

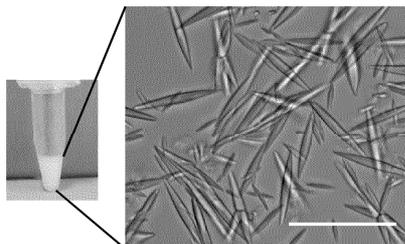
A



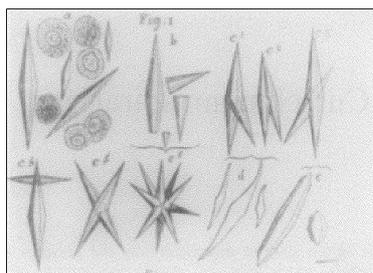
B



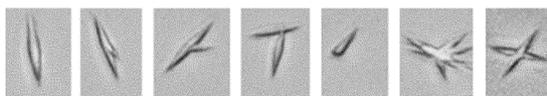
C



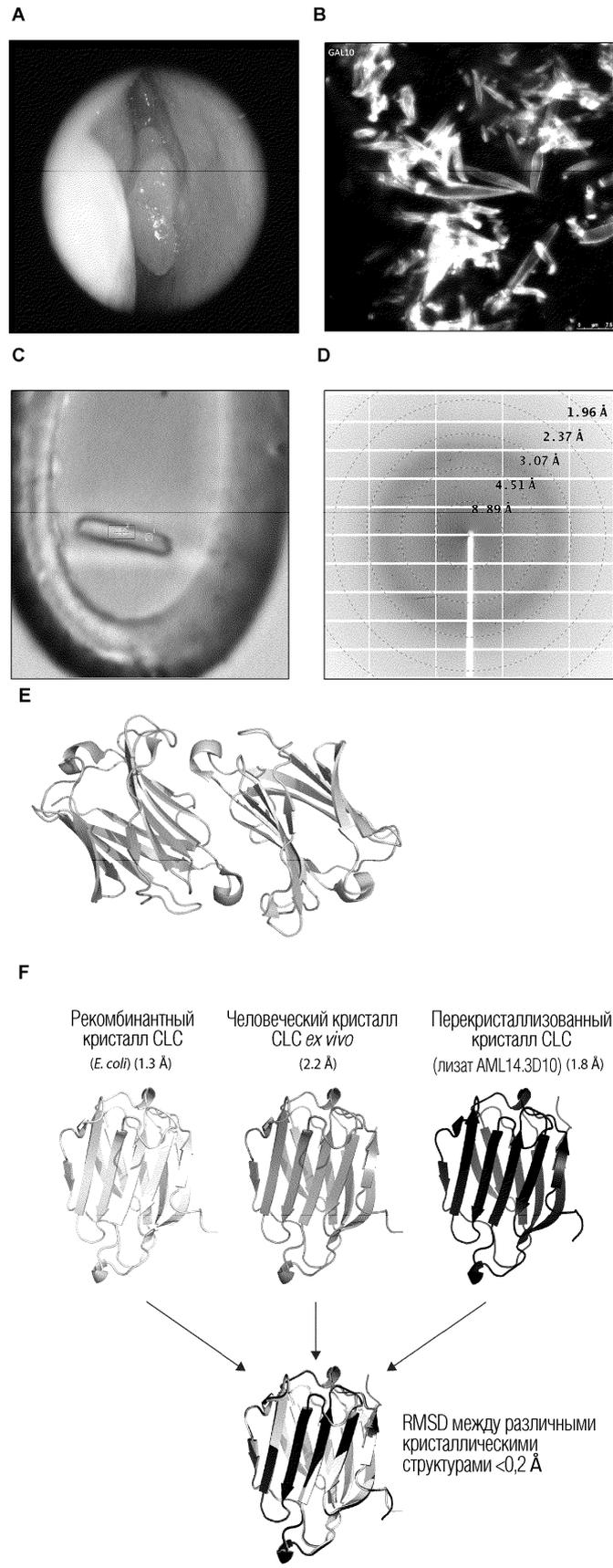
D



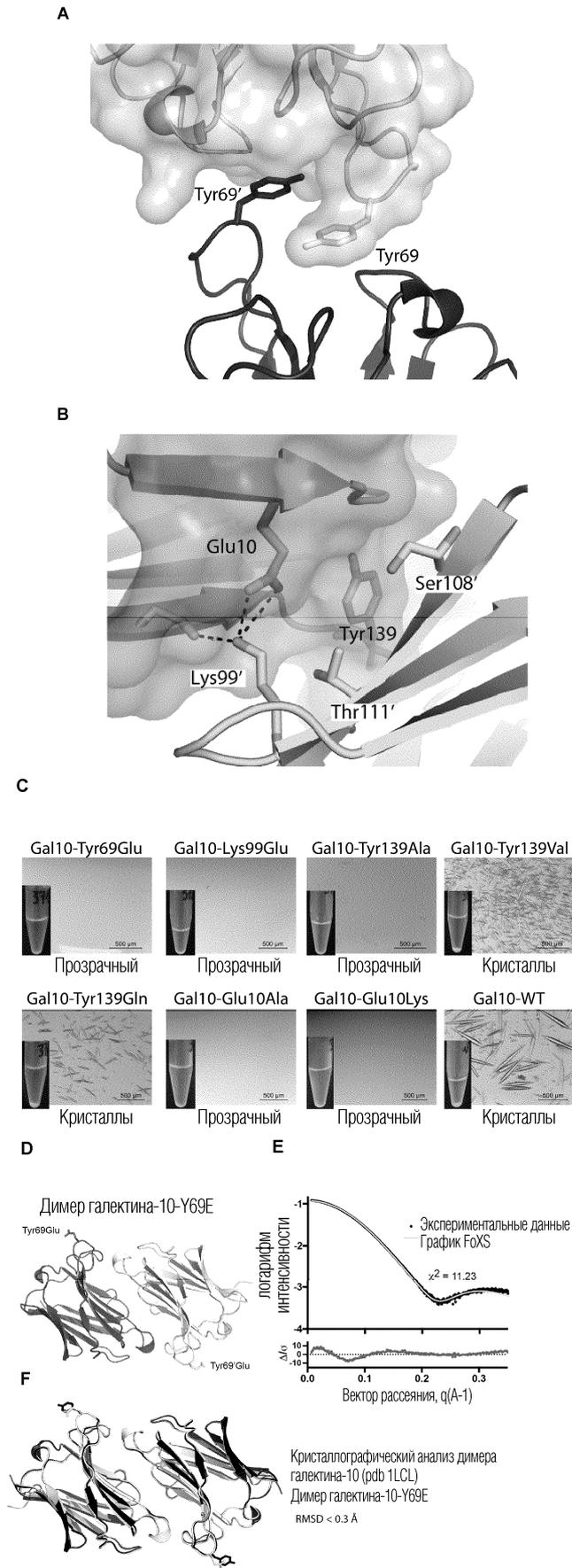
E



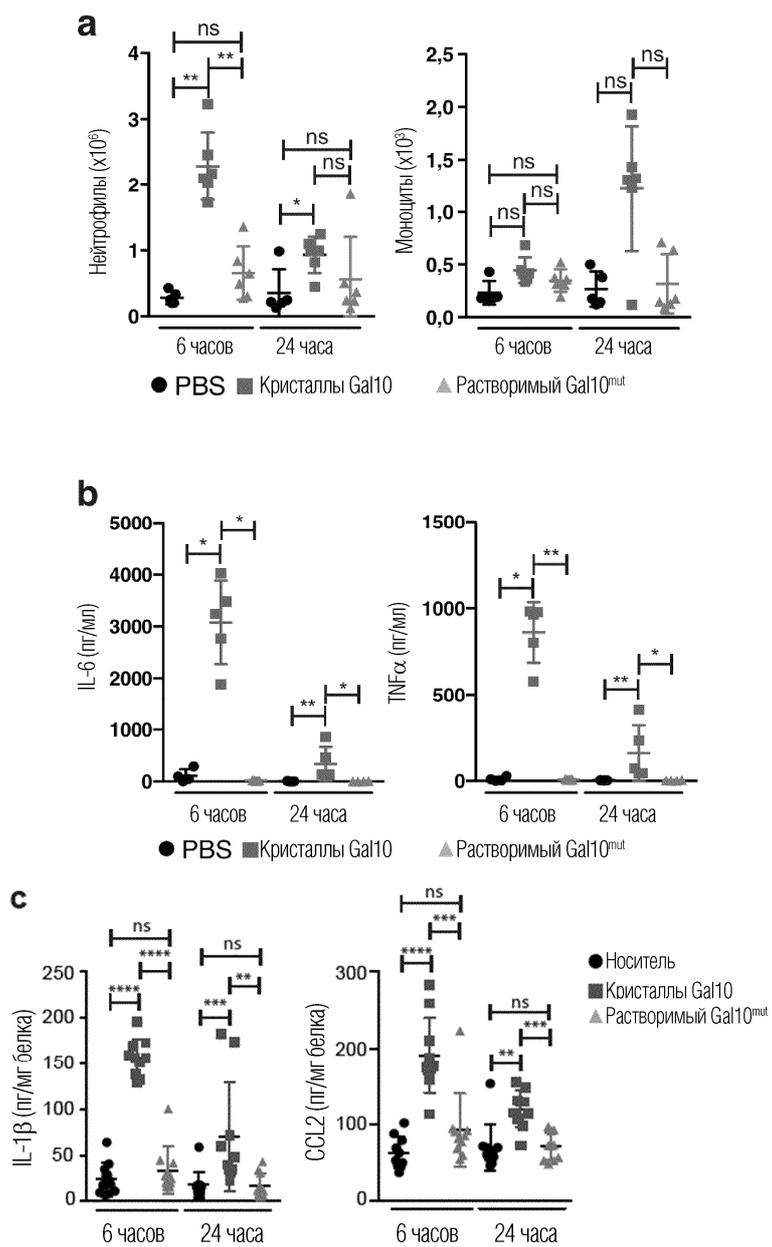
Фиг. 1



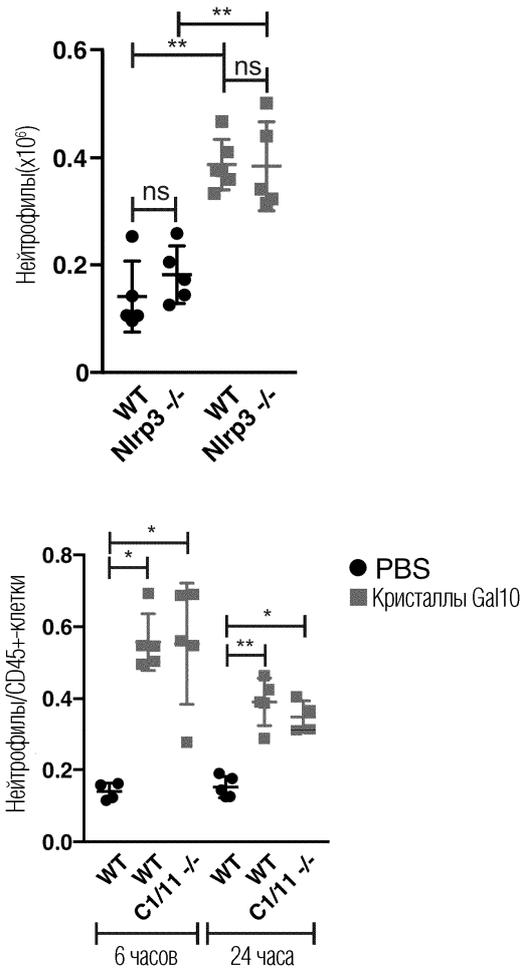
Фиг. 2



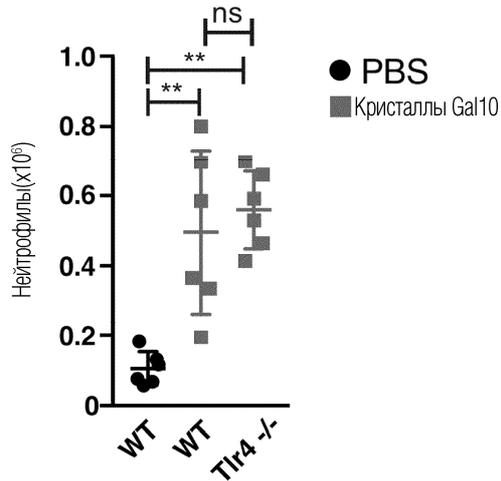
Фиг. 3



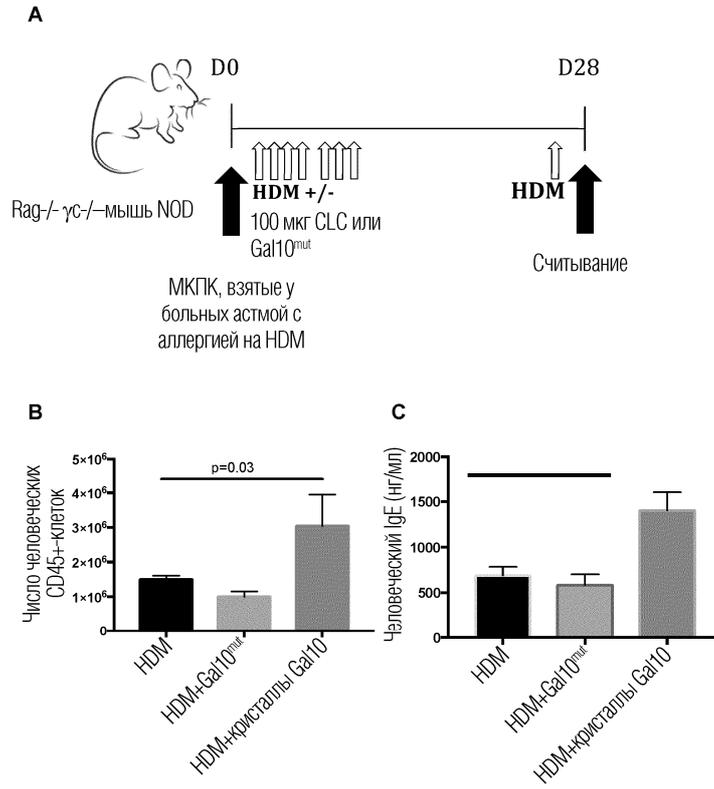
Фиг. 4



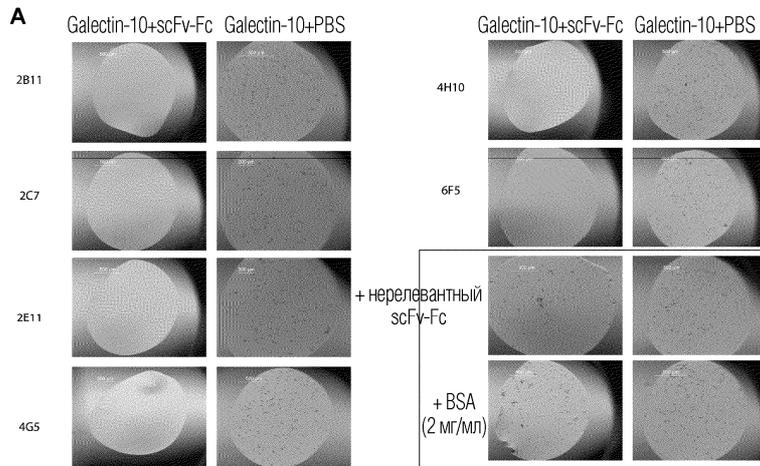
Фиг. 5



Фиг. 6

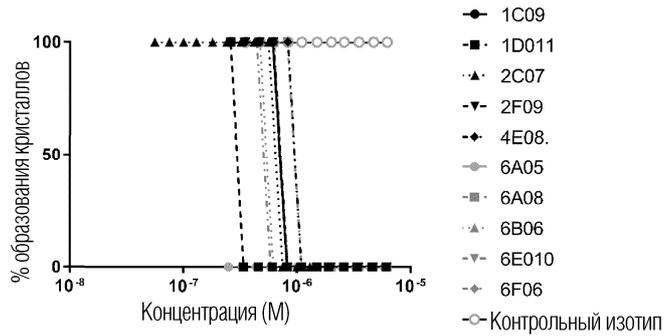
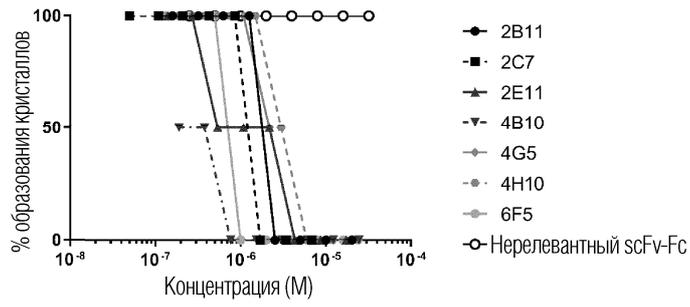


Фиг. 7



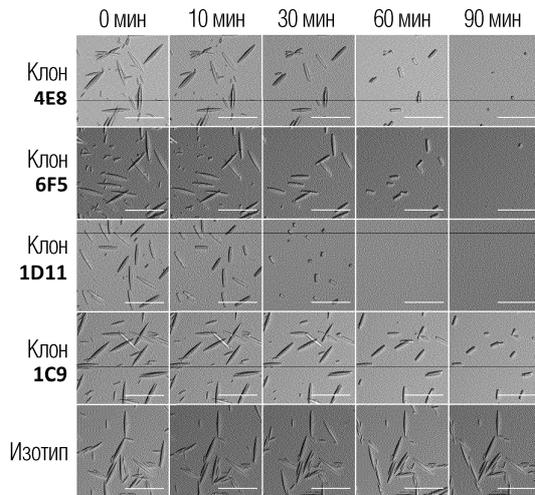
Фиг. 8

**В**

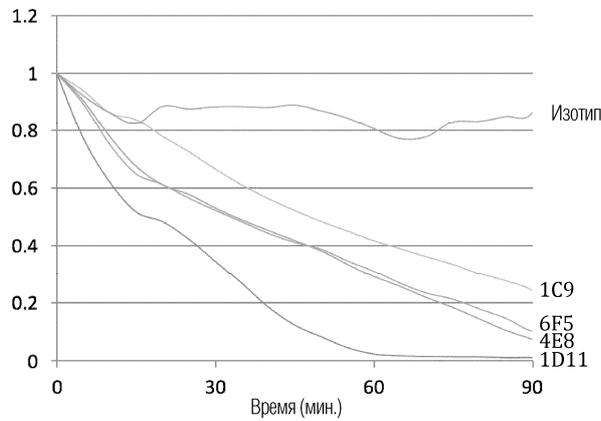


Фиг. 8 (продолжение)

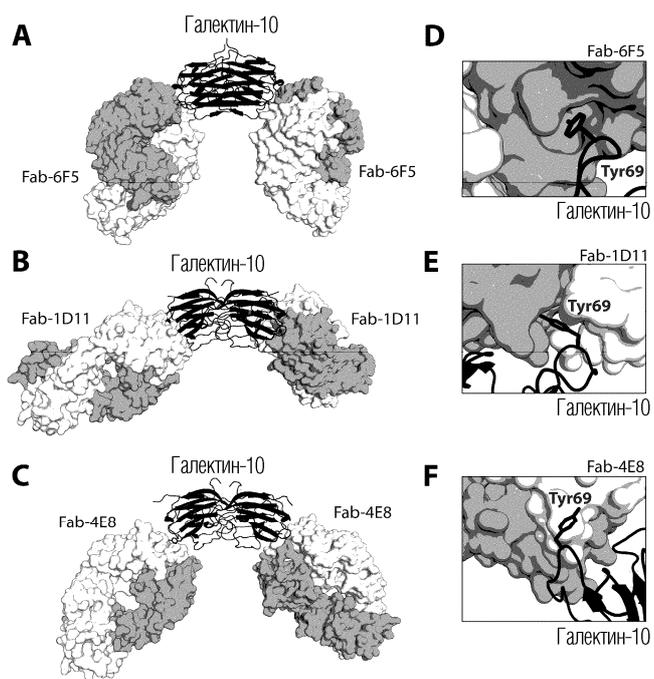
**А**



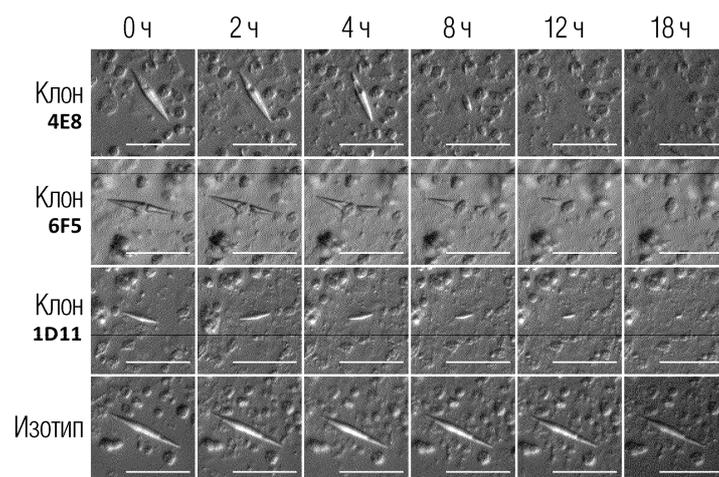
**В**



Фиг. 9

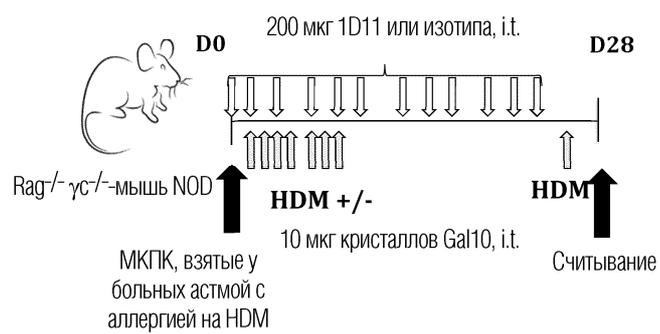


Фиг. 10

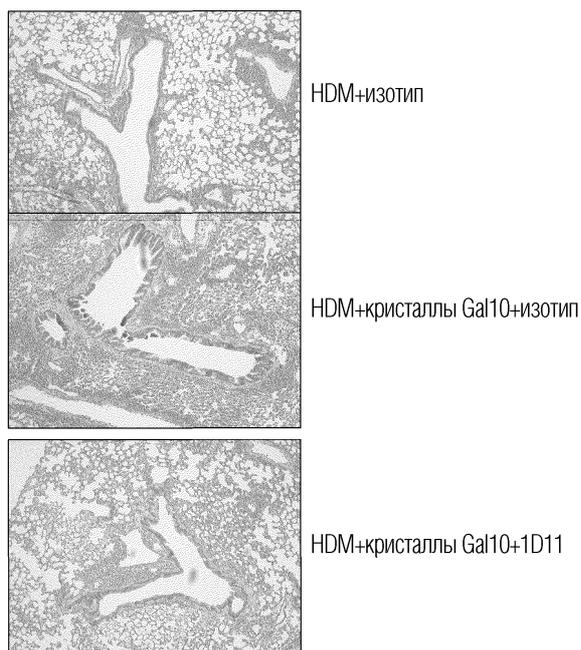


Фиг. 11

A

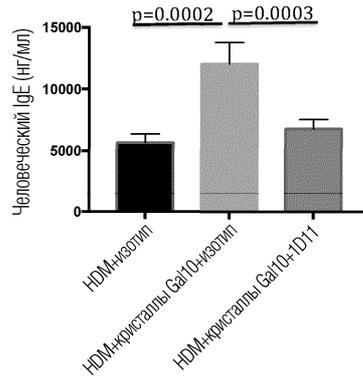


B

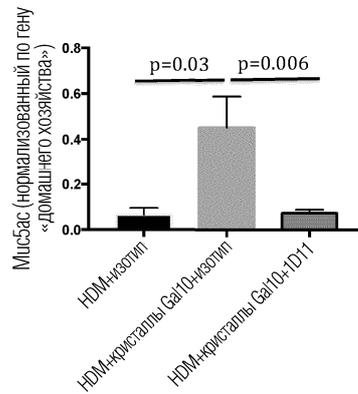


Фиг. 12

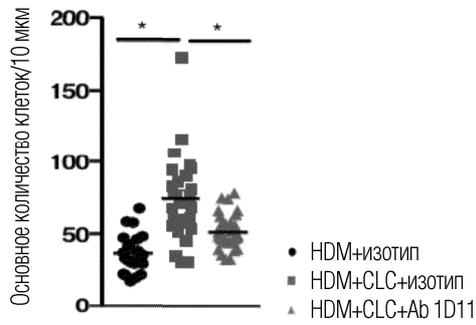
C



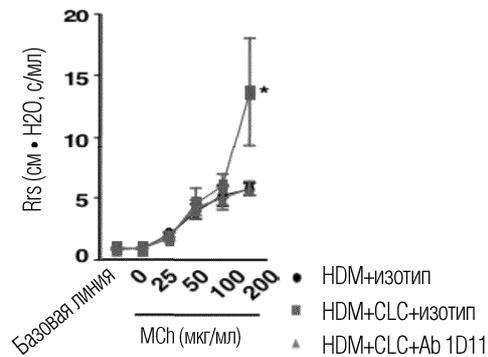
D



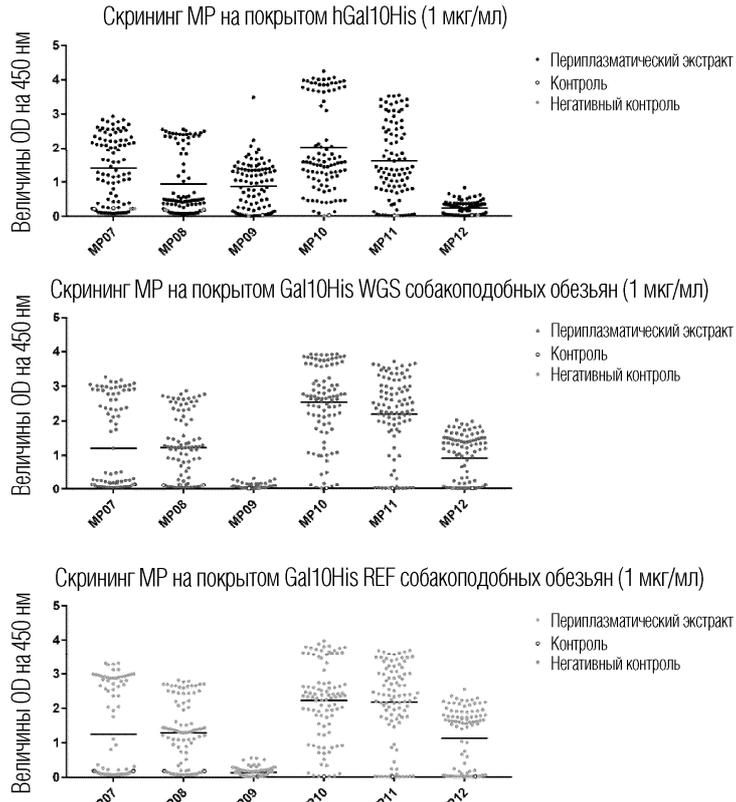
E



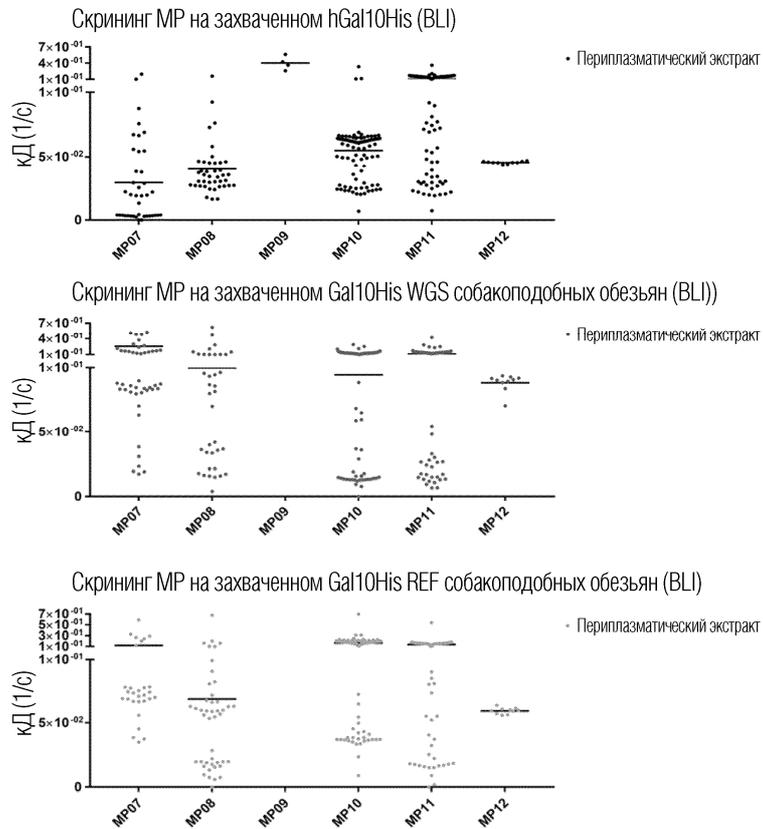
F



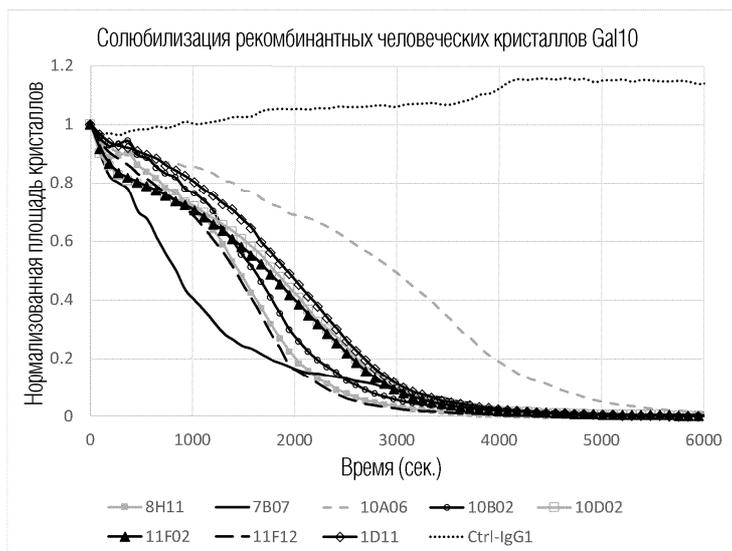
Фиг. 12 (продолжение)



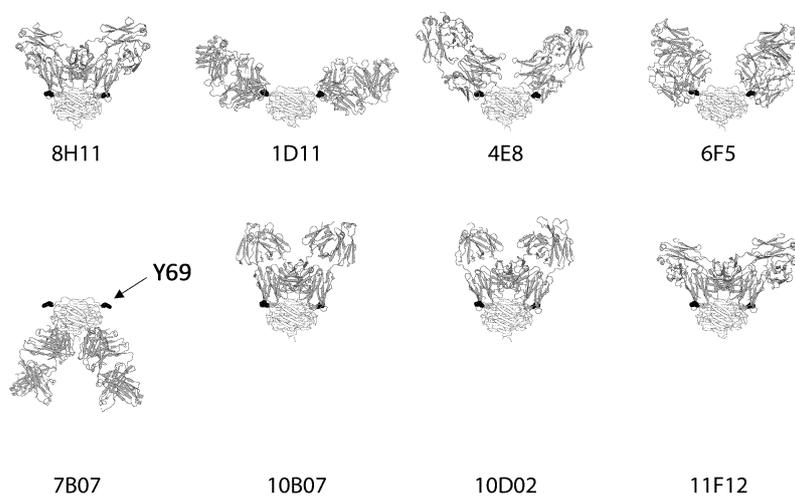
Фиг. 13



Фиг. 14

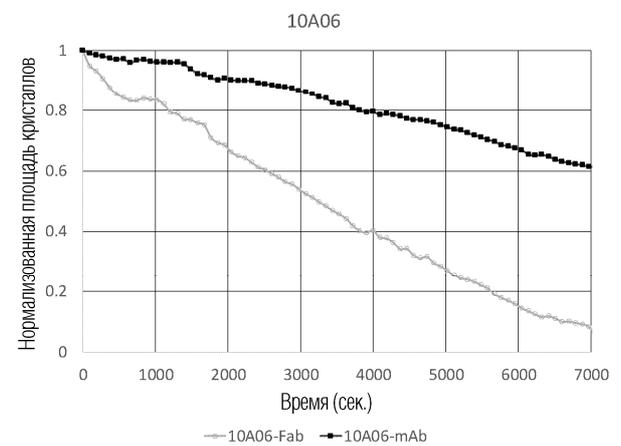
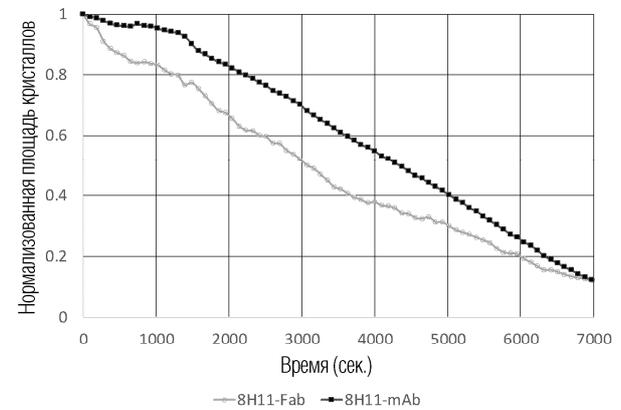
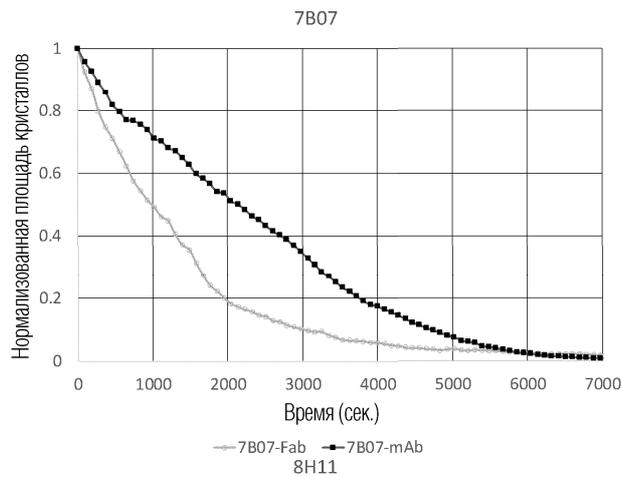
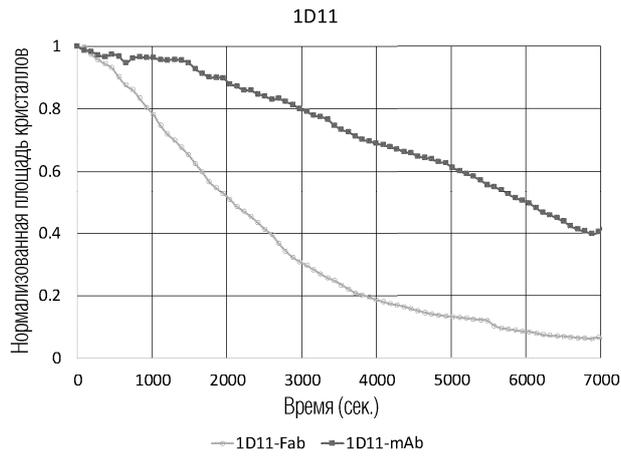


Фиг. 15



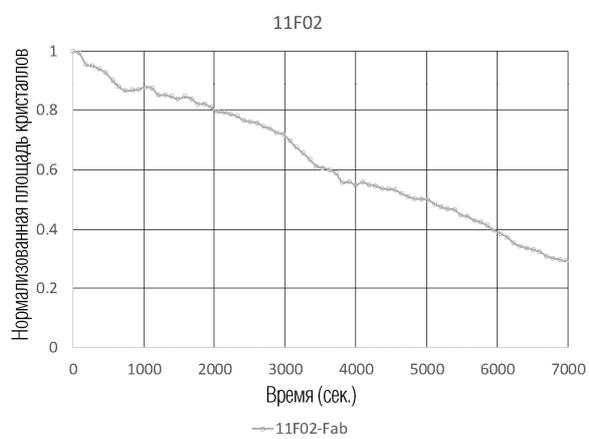
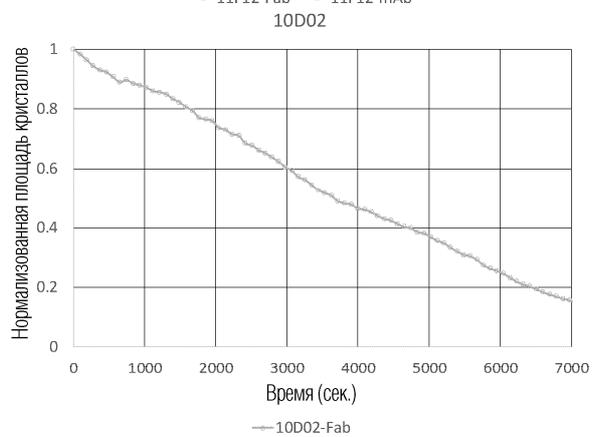
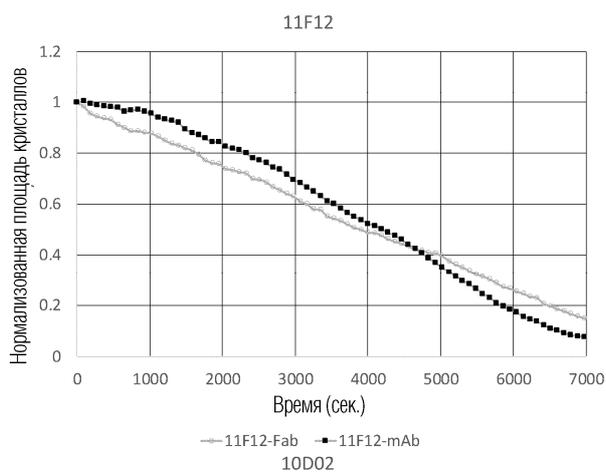
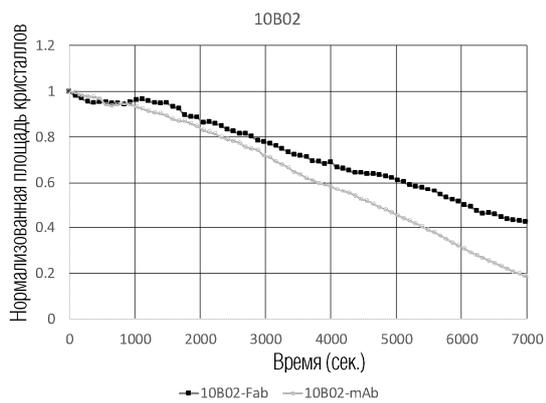
Фиг. 16

047651

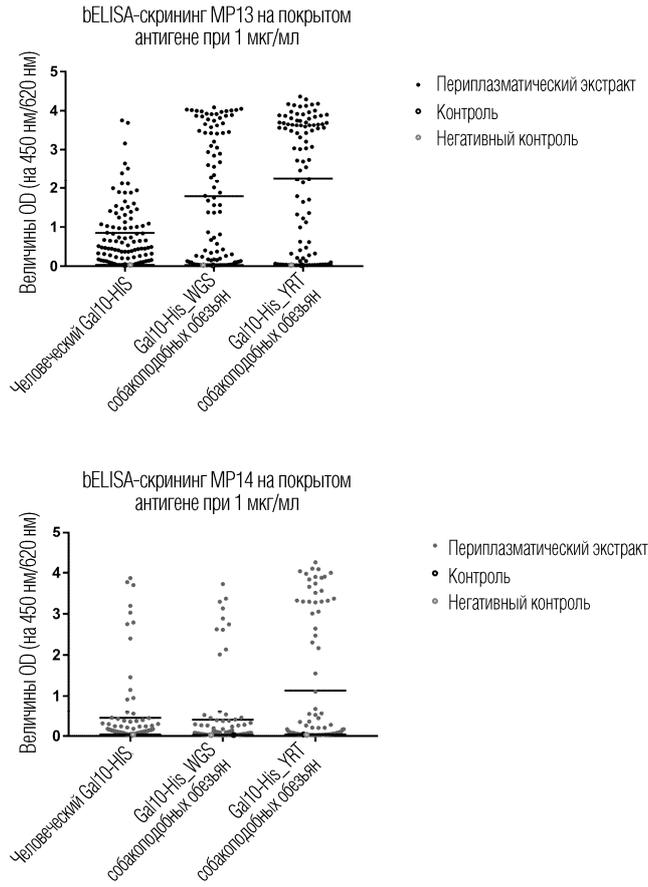


Фиг. 17

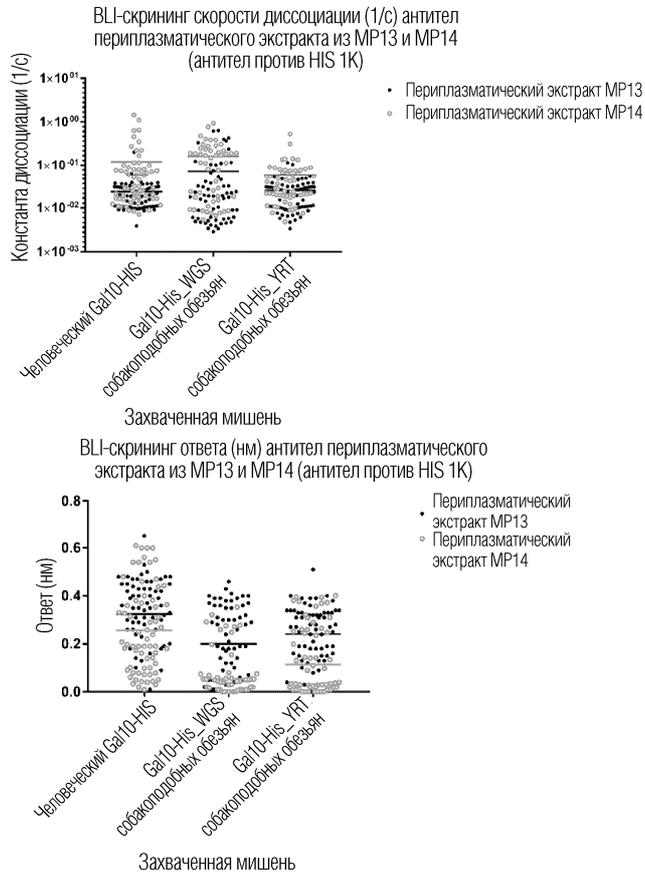
047651



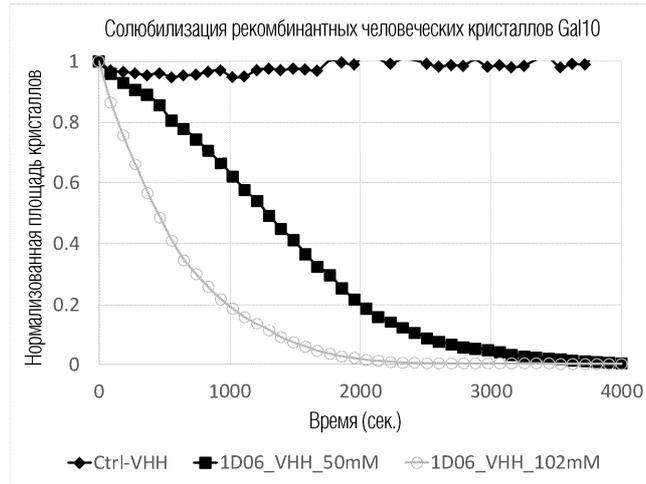
Фиг. 17 (продолжение)



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20

