

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392146** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.01.18

(51) Int. Cl. *A61P 29/00* (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.05.04

(54) **ИНГИБИРОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК**

(31) **21172160.0; 2111541.5**

(32) **2021.05.04; 2021.08.11**

(33) **EP; GB**

(86) **PCT/EP2022/061970**

(87) **WO 2022/233931 2022.11.10**

(71) Заявитель:
ЦИТРИЛЛ Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:

**Ван Эс Хельмут Хендрикус Герардус,
Кирави Ренато Герардус Сильвано,
Монтизан Дафне, Мельдрум Эрик
Чарльз (NL)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам ингибирования образования эозинофильных внеклеточных ловушек (ЭВЛ). В частности, настоящее изобретение относится к антителам или их связывающим фрагментам, направленным против цитруллин-содержащих эпитопов, для применения в способах ингибирования или обнаружения образования ЭВЛ. Указанные способы могут быть предназначены для диагностики, лечения или предотвращения любого заболевания или состояния, которое включает патологию, связанную с ЭВЛ.

A1

202392146

202392146

A1

ИНГИБИРОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК

Область техники

В рамках настоящего изобретения предложены способы ингибирования образования эозинофильных внеклеточных ловушек (ЭВЛ). В частности, в рамках
5 настоящего изобретения предложены антитела или их связывающие фрагменты, направленные против цитруллин-содержащих эпитопов, для применения в способах ингибирования или обнаружения образования ЭВЛ. Указанные способы могут быть предназначены для диагностики, лечения или предотвращения любого заболевания или состояния, которое включает патологию, связанную с ЭВЛ. В рамках
10 настоящего изобретения дополнительно предложены антитела или их связывающие фрагменты, направленные против цитруллин-содержащих эпитопов, для применения в способах лечения или предотвращения состояний легких, в частности воспалительных состояний легких. Описанные антитела или их связывающие фрагменты, направленные против цитруллин-содержащих эпитопов, можно также
15 применять при ингибировании образования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), в частности при состояниях легких. В некоторых вариантах реализации может ингибироваться образование как эозинофильных внеклеточных ловушек (ЭВЛ), так и нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ).

Уровень техники

Эозинофилы представляют собой форму циркулирующих лейкоцитов, обычно составляющих приблизительно от 1 до 3% белых кровяных клеток (лейкоцитов) у здорового человека. Они играют разнообразные роли в гомеостазе и различных заболеваниях, включая аллергию и инфекцию. Установлено, что особый
25 механизм гибели активированных цитолитических эозинофильных клеток высвобождает эозинофильные внеклеточные ловушки (ЭВЛ) и все клеточное содержимое. Этот процесс называется гибелью эозинофилов с выбросом внеклеточных ловушек (ЭЭТоз). Также было показано, что с ЭЭТозом связаны кристаллы Шарко — Лейдена (классический патологический маркер
30 эозинофильного воспаления), и наличие ЭЭТоза и ЭВЛ было зарегистрировано при многих заболеваниях.

Внешне схожий процесс, характеризующийся образованием нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), был идентифицирован у нейтрофилов, и его называют НЕТозом. НВЛ связаны с различными патологиями, и ингибирование

НВЛ в качестве лечения обсуждается, например, в WO2009147201, WO2011070172, WO2016092082 и WO2020038963.

Несмотря на то, что ЭЭТоз и НЕТоз имеют некоторые общие характеристики, такие как сходные процессы, зависящие от НАДФН-оксидазы, морфологические изменения в ядре и разрыв плазматической/ядерной мембраны, между ними также существует много различий. Например, у нейтрофилов и эозинофилов имеются различия в структурах гранул и образующихся внеклеточных ловушек. Когда нейтрофилы подвергаются НЕТозу, гранулы распадаются внутриклеточно, и, таким образом, белки гранул прикрепляются к НВЛ. Напротив, большинство гранул в эозинофилах интактны во время процесса ЭЭТоза, что приводит к образованию свободных внеклеточных гранул и ЭВЛ, не содержащих белков гранул. Как НВЛ, так и ЭВЛ сохраняют гистоны (т. е. структуру хроматина), но ЭВЛ имеют больший диаметр, чем НВЛ, из-за менее обширной модификации хроматина протеазами. Известно, что цитруллинирование гистонов (например, опосредованное ферментом PAD4) играет ключевую роль в образовании НВЛ, но доказательства такой же значительной роли в образовании ЭВЛ неубедительны.

Учитывая эти различия, необходимо дальнейшее изучение ЭВЛ/ЭЭТоза, чтобы получить подробное представление о роли, которую они играют в гомеостазе и патогенезе заболеваний, а также о механизме образования ЭВЛ и о том, как его можно ингибировать. Другими словами, сохраняется потребность в получении соединений для лечения или предотвращения патологий, связанных с ЭВЛ.

Учитывая, что эозинофилы и нейтрофилы часто играют роль в патологических процессах, лежащих в основе состояний легких, также существует неудовлетворенная потребность, в частности, в способах, нацеленных на их участие в таких состояниях.

Краткое описание изобретения

Имеются противоречивые данные о роли цитруллинирования гистонов в образовании ЭВЛ. Неожиданно, авторы настоящего изобретения обнаружили, что антитело, которое связывается с цитруллинированными эпитопами на аминоконце гистона 2A и/или гистона 4, способно ингибировать ЭЭТоз и, таким образом, может применяться в способах ингибирования образования ЭВЛ. Способы могут быть предназначены для лечения или предотвращения патологии, связанной с ЭВЛ. Такие патологии могут включать: эозинофильное заболевание кожи; респираторное

эозинофильное заболевание; желудочно-кишечное эозинофильное заболевание; аллергическое заболевание; или гельминтную, грибковую, вирусную или бактериальную инфекцию. Кроме того, также можно лечить или предотвращать артериосклероз. В другом варианте реализации изобретения также можно лечить

5 васкулит.

Учитывая различия между ЭВЛ и НВЛ, авторы настоящего изобретения неожиданно дополнительно обнаружили, что можно ингибировать образование как ЭВЛ, так и НВЛ, применяя одно и то же антитело, которое связывается с цитруллинированными эпитопами на аминоконце гистона 2А и/или гистона 4, в том

10 числе при одном и том же состоянии. Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что такие антитела можно применять для лечения различных состояний, включая заболевания легких, в частности воспалительные заболевания легких, включая астму. Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что такие антитела можно применять для лечения состояний, связанных с повышенным

15 количеством инфильтрирующих нейтрофилов. Авторы настоящего изобретения дополнительно обнаружили, что такие антитела можно применять для лечения состояний, связанных с повышенным количеством инфильтрирующих эозинофилов.

Авторы настоящего изобретения дополнительно обнаружили, что подход с применением того же антитела, которое связывается с цитруллинированными

20 эпитопами на аминоконце гистона 2А и/или гистона 4, может в некоторых случаях обеспечивать больший эффект, чем кортикостероиды и/или другое антитело. Следовательно, настоящее изобретение также можно применять для лечения индивидуумов, которые не демонстрируют адекватного ответа на кортикостероиды. Например, настоящее изобретение можно применять для лечения индивидуума, у

25 которого имеется состояние, устойчивое к кортикостероидам. Также возможна ситуация, когда антитело и кортикостероид применяют в комбинации таким образом, что они дополняют друг друга, и это представляет собой дополнительный предпочтительный вариант реализации. В одном из вариантов реализации кортикостероид представляет собой дексаметазон.

30 Примеры антител, которые связываются с цитруллинированными эпитопами на дезиминированном гистоне 2А и гистоне 4 человека, описаны, например, в WO2009147201, WO2011070172, WO2016092082 и WO2020038963. Каждый из этих документов и антитела, раскрытые в них (включая все последовательности CDR, последовательности переменных областей и последовательности константных

областей как тяжелой, так и легкой цепей), включены в настоящую заявку посредством ссылки. В частности, каждое из антител, обозначенных RhmAb2.102, RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 RhmAb2.112, MQ22.101, MQ22.102 и MQ22.101b/d в WO2016092082, и любой их антигенсвязывающий фрагмент включены посредством ссылки. Аналогичным образом, каждое из антител, описанных с идентификаторами формата hMQ22.101x/y в WO2020038963, и любой их антигенсвязывающий фрагмент включены в настоящую заявку посредством ссылки. Антитела, описанные в WO2020038963, особенно предпочтительны и более подробно обсуждаются ниже. Антитело, указанное в WO2020038963 как hMQ22.101f/LC41, является наиболее предпочтительным. Это антитело может быть описано в настоящей заявке как СІТ-013. В настоящем изобретении предложено следующее:

Способ ингибирования или обнаружения образования эозинофильных внеклеточных ловушек (ЭВЛ), включающий введение в образец или введение субъекту антитела или его связывающего фрагмента, которые специфично связываются с цитруллинированным эпитопом на дезиминированном гистоне 2А и/или гистоне 4 человека. Предпочтительно образец или субъект представляют собой образец или субъекта, в котором или у которого присутствуют эозинофилы.

Способ может быть предназначен для предотвращения или лечения заболевания или состояния у субъекта и, таким образом, может включать введение указанного антитела или его связывающего фрагмента субъекту в профилактически или терапевтически эффективном количестве.

Заболевание или состояние, обычно включает патологию, связанную с ЭВЛ. Заболевание или состояние может представлять собой эозинофильное заболевание или состояние. Эозинофильные заболевания и состояния могут включать: эозинофильное заболевание или состояние кожи; респираторное эозинофильное заболевание или состояние; желудочно-кишечное эозинофильное заболевание или состояние; аллергическое заболевание или состояние; или гельминтную, грибковую, вирусную или бактериальную инфекцию.

Также предложено антитело или его связывающий фрагмент, которые специфично связываются с цитруллинированным эпитопом на дезиминированном гистоне 2А и/или гистоне 4 человека, для применения в вышеуказанных способах, в частности, в вышеуказанных способах предотвращения или лечения заболевания или состояния у субъекта. Также предложено антитело или его связывающий

фрагмент, которые специфично связываются с цитруллинированным эпитопом на дезиминированном гистоне 2А и/или гистоне 4 человека, для применения при производстве лекарственного средства для применения в вышеуказанных способах предотвращения или лечения заболевания или состояния у субъекта. В одном из
5 вариантов реализации проводят лечение артериосклероза. В другом варианте реализации проводят лечение васкулита.

В качестве альтернативы способ может быть предназначен для ингибирования или обнаружения образования ЭВЛ *ex vivo* в образце. Способ может быть применен для диагностики наличия патологии, связанной с ЭВЛ.

10 В некоторых вариантах реализации указанный способ может ингибировать образование эозинофильных внеклеточных ловушек (ЭВЛ) и нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ).

Также предложен способ лечения или предотвращения нарушения легких, включающий введение антитела или его связывающего фрагмента, которые
15 специфично связываются с цитруллинированным эпитопом на дезиминированном гистоне 2А и/или гистоне 4 человека, субъекту с указанным нарушением легких.

Краткое описание перечня последовательностей

Номенклатура антител

20 CDR — определяющий комплементарность участок.

VH — переменный домен тяжелой цепи.

VL — переменный домен легкой цепи.

CH — константный домен тяжелой цепи.

CL — константный домен легкой цепи.

25 msVH22.101 — мышинный VH терапевтического антитела.

msVL22.101 — мышинный VL терапевтического антитела.

hVH22.101x — гуманизированный VH терапевтического антитела, «x» обозначает тяжелую цепь.

hVL22.101y — гуманизированный VL терапевтического антитела, «y» обозначает
30 легкую цепь.

hVH22.101 (HC)x — оптимизированный гуманизированный VH терапевтического антитела, «(HC)x» обозначает тяжелую цепь.

hVL22.101 (LC)y — оптимизированный гуманизированный VL терапевтического антитела, «(LC)y» обозначает легкую цепь.

hMQ22.101x/y — гуманизированное терапевтическое антитело, «x» обозначает тяжелую цепь, «y» обозначает легкую цепь.

hMQ22.101 (HC)x/(LC)y — оптимизированное гуманизированное терапевтическое антитело согласно настоящему изобретению, «(HC)x» обозначает тяжелую цепь,

5 «(LC)y» обозначает легкую цепь.

SEQ ID NO	Белок	Название
1	белок	CDR1, относящийся к msVH22.101 и hVH22.101(HC)x
2	белок	CDR2, относящийся к msVH22.101 и hVH22.101(HC)x
3	белок	CDR3, относящийся к msVH22.101 и hVH22.101(HC)x
4	белок	CDR2, относящийся к msVL22.101 и hVL22.101(LC)y
5	белок	CDR3, относящийся к msVL22.101 и hVL22.101(LC)y
6	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101LC17
7	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101LC21
8	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101LC27
9	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101LC41
10	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101LC42
11	белок	hVH22.101f
12	белок	hVH22.101HC9
13	белок	hVL22.101LC17
14	белок	hVL22.101LC21
15	белок	hVL22.101LC27
16	белок	hVL22.101LC41
17	белок	hVL22.101LC42
18	белок	SEQ ID NO 1 из WO2016092082 — Пример 1, гистон 2A
19	белок	SEQ ID NO 2 из WO2016092082, гистон 4
20	белок	Укороченная SEQ ID NO 2 из WO2016092082 — Пример 7, гистон 4
21	белок	Пептид № 4 (гистон 2A человека) (SEQ ID NO 24 из WO2011070172)
22	белок	Пептид № 6 (гистон 2A человека) (SEQ ID NO 26 из WO2011070172)
23	белок	Константный домен тяжелой цепи человеческого IgG1 — предпочтительный константный домен тяжелой цепи, относящийся к hCH22.101f
24	белок	Константный домен каппа-цепи иммуноглобулина человека
25	белок	msVH22.101
26	белок	hVH22.101j
27	белок	hVH22.101HC7
28	белок	hVH22.101HC8
29	белок	hVH22.101HC10
30	белок	msVL22.101
31	белок	hVL22.101e
32	белок	hVL22.101g
33	белок	hVL22.101h
34	белок	hVL22.101i
35	белок	hVL22.101j
36	белок	CDR1, относящийся к msVL22.101 и hVL22.101g
37	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101e

38	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101h
39	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101i
40	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101j
41	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101LC16
42	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101LC19
43	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101LC20
44	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101LC22
45	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101LC23
46	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101LC24
47	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101LC25
48	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101LC26
49	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101LC37
50	белок	CDR1, относящаяся к hVL22.101LC38
51	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101LC39
52	белок	CDR1, относящийся к hVL22.101LC40
53	белок	msFib β XG (SEQ ID NO 37 из WO2011070172)
54	белок	msVim XS/XL (SEQ ID NO 38 из WO2011070172)
55	белок	Область вокруг CDR2, относящегося к msVL22.101 и hVL22.101(LC) _y
56	белок	Альтернативный константный домен тяжелой цепи hCH22.101f — единственное отличие от SEQ ID NO: 23 представляет собой дополнительный С-концевой К, который обычно удаляется при внутриклеточном процессинге.

Краткое описание чертежей

- 5 **Фигура 1.** (а) Примеры изображений эозинофилов, стимулированных к образованию ЭВЛ с помощью A23187 или PMA, без антитела, в присутствии СІТ-013 или изотипического контроля; (b) графическое представление уровня образования ЭВЛ в образцах эозинофилов от разных доноров при стимуляции в тех же условиях, что и на панели (а).
- 10 **Фигура 2.** Влияние антитела tАСРА и дексаметазона на мышиную модель воспаления дыхательных путей, вызванного аллергеном клеща домашней пыли (HDM). (а) Уровни эозинофилов в бронхиальном лаваже; (b) уровни нейтрофилов в бронхиальном лаваже; (с) уровень цитруллинированного гистона 3 в качестве маркера внеклеточных ловушек (ВЛ); (d) уровень периваскулярной нейтрофилии; (е)
- 15 уровень периваскулярных мононуклеарных клеток; и (f) уровень бронхиолярной нейтрофилии.
- Фигура 3.** Влияние лечения антителом tАСРА на мышиную модель воспаления дыхательных путей. (а) Концентрация дцДНК в бронхиальном лаваже; (b), (с), (d)

соответственно уровни внеклеточного цитНЗ, внеклеточного МРО и НВЛ в тканях легких, залитых парафином; (e), (f), (g) соответственно количество эозинофилов, нейтрофилов, макрофагов в тканях легких, залитых парафином; (h) процент фагоцитарных макрофагов в тканях легких, залитых парафином.

- 5 **Фигура 4.** СИТ-013 ингибирует ЭЭТоз, индуцированный иммунными комплексами. (a) Пример изображения ЭЭТоза в нестимулированных эозинофилах, эозинофилах, стимулированных иммунными комплексами, эозинофилах, стимулированных иммунными комплексами в присутствии СИТ-013, и эозинофилах, стимулированных иммунными комплексами в присутствии антитела изотипического контроля. (b)
- 10 Уровень ЭВЛ (в % от количества клеток) в присутствии СИТ-013 или антитела изотипического контроля, показанный вместе с разностью между двумя условиями (Δ) (n = 8 доноров).

Подробное описание изобретения

- 15 Следует понимать, что различные способы применения раскрытого изобретения могут быть адаптированы к конкретным потребностям в данной области техники. Также следует понимать, что используемая в настоящей заявке терминология предназначена только для описания конкретных вариантов реализации изобретения и не является ограничивающей.

- 20 Кроме того, использование в настоящем описании изобретения, в том числе в прилагаемой формуле изобретения, понятия в единственном числе включает это понятие во множественном числе, если содержание текста не указывает явно на иное. Таким образом, например, слово «антитело» включает «антитела» и т. п.

- 25 Все публикации, патенты и заявки на патенты, цитируемые в данной заявке, выше или ниже, включены в настоящую заявку в полном объеме посредством ссылки.

Мишени антитела или его связывающего фрагмента, подходящих для применения в способах по изобретению

- 30 Цитруллин — это аминокислота, которая не включается в белки во время нормальной трансляции, однако она может быть образована в результате посттрансляционной модификации остатка аргинина дезимилирующими ферментами, такими как пептидил-аргинин-дезиминаза (PAD; EC 3.5.3.15). У млекопитающих (люди, мыши и крысы) к настоящему времени идентифицировано

пять изоформ PAD (PAD1–PAD6; обозначения «PAD4» и «PAD5» используют для одного и того же изоформы), каждый из которых кодируется отдельным геном. Таким образом, термины «дезиминование» и «цитруллинование» могут использоваться как взаимозаменяемые. Цитруллинование гистона 2A и/или гистона 4 человека, как правило, может быть осуществлено, например, с помощью PAD2 и PAD4. Цитруллинование этих гистонов связано с патологическим образованием НВЛ, но до настоящего изобретения не было убедительных доказательств того, что существует сопоставимая связь с патологическим образованием ЭВЛ.

10 Антитела или их связывающие фрагменты, подходящие для применения в способах по изобретению, специфично связываются с цитруллинованным эпитопом на дезиминованном гистоне 2A и/или гистоне 4 человека. Антитела могут также специфично связываться с цитруллинованным эпитопом на дезиминованном гистоне H3 человека. Антитела или их связывающие фрагменты
15 могут специфично связываться с цитруллинованным эпитопом на дезиминованном гистоне 2A и/или гистоне 4 человека, при этом эпитоп содержит пептид, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21 и 22. Антитела или их связывающие фрагменты могут также связываться с эпитопами, содержащими пептиды с SEQ ID NO: 53 или 54.

20

Антитела или их связывающие фрагменты

Используемые в настоящей заявке термины «антитела», «антитело» или «их/его связывающий фрагмент» относятся к структуре, предпочтительно белковой или полипептидной структуре, способной к специфичному связыванию с целевой молекулой, часто называемой «антигеном».

25 Описываемая в настоящей заявке молекула антитела относится к антителу или его связывающему фрагменту. Термин «антитело», используемый в настоящей заявке, в общем случае относится к интактным (целым) антителам, т. е. содержащим элементы двух тяжелых цепей и двух легких цепей. Антитело может включать
30 дополнительные связывающие домены, как, например, у молекулы DVD-Ig, описанной в WO 2007/024715, или в так называемой молекуле (FabFv)₂Fc, описанной в WO 2011/030107. Таким образом, используемый в настоящей заявке термин «антитело» включает моно-, би-, три- или четырехвалентные полноразмерные антитела.

Связывающие фрагменты антител включают одноцепочечные антитела (т. е. полноразмерную тяжелую цепь и легкую цепь); Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', F(ab')₂, Fv, Fab-Fv, Fab-dsFv, однодоменные антитела (например, VH, или VL, или VHH), scFv, моно-, би-, три - или четырехвалентные антитела, Bis-scFv, диатела, триатела, тетратела и эпитоп-связывающие фрагменты
5 любой из вышеперечисленных структур (см., например, Holliger P and Hudson PJ, 2005, Nat. Biotechnol., 23, : 1126-1136; Adair JR and Lawson ADG, 2005, Drug Design Reviews – Online, 2, 209-217). Способы создания и получения этих фрагментов антител хорошо известны специалистам в данной области техники (см., например,
10 Verma R *et al.*, 1998, J. Immunol. Methods, 216, 165-181). Формат Fab-Fv был впервые описан в WO2009/040562, а его стабилизированная дисульфидными связями версия (Fab-dsFv) впервые была описана в WO2010/035012. Другие фрагменты антител, которые можно применять в настоящем изобретении, включают фрагменты Fab и Fab'. Мультивалентные антитела могут обладать несколькими специфичностями,
15 например, они могут быть биспецифическими или могут быть моноспецифическими.

Антитело или его связывающий фрагмент могут быть выбраны из группы, состоящей из одноцепочечных антител, одноцепочечных переменных фрагментов (scFv), переменных фрагментов (Fv), антигенсвязывающих фрагментов (Fab), рекомбинантных антител, моноклональных антител, химерных белков, содержащих
20 антигенсвязывающий домен нативного антитела или аптамер, однодоменных антител (sdAb), также известных как антитела VHH, нанотел (однодоменные антитела семейства верблюдовых), однодоменных фрагментов антител IgNAR акулы, называемых VNAR, диател, триател, антикалинов, аптамеров (ДНК или РНК) и их активных компонентов или фрагментов.

25 Для реализации изобретения можно успешно применять антитела IgG1 (например, IgG1/каппа), имеющие тяжелую цепь и легкую цепь IgG1. Однако другие изотипы человеческих антител также включены в изобретение, в том числе IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD и IgE в комбинации с легкой цепью каппа или лямбда. Также для реализации изобретения можно применять все антитела
30 животного происхождения различных изотипов. Антитела могут быть полноразмерными антителами или антигенсвязывающими фрагментами антител, включая Fab, F(ab')₂, одноцепочечные фрагменты Fv или однодоменные VHH или одиночные домены VH или VL.

Выражение «специфично связывается с цитруллином» или «специфично связывается с цитруллинированным эпитопом» в данном контексте означает, что антитело или его связывающий фрагмент связывается с такой структурой, как пептид, содержащий остаток цитруллина, при этом антитело или его связывающий
5 фрагмент связывается менее прочно или предпочтительно совсем не связывается с такой же структурой, содержащей остаток аргинина вместо остатка цитруллина. Термин «пептид» следует понимать как структуру, которая способна представлять остаток цитруллина в правильном контексте для обеспечения иммунореактивности с антителами или их связывающими фрагментами, как описано в данной заявке,
10 предпочтительно в том же контексте, в котором это происходит в организме человека или животного, предпочтительно в контексте нативного полипептида.

Антитела или их связывающие фрагменты, подходящие с точки зрения авторов изобретения для способов по настоящему изобретению, специфично связываются с цитруллинированным эпитопом на дезиминированном гистоне 2А
15 и/или гистоне 4 человека. Связывание антител или их связывающих фрагментов с цитруллинированным эпитопом на дезиминированном гистоне 2А и/или гистоне 4 человека блокирует образование ЭВЛ. Цитруллинирование гистонов связано с образованием ЭВЛ.

Блокирование образования ЭВЛ может быть полным или частичным.
20 Например, антитело или его связывающий фрагмент могут снижать образование ЭВЛ на 10–50%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 95% или 99%. Блокирование ЭВЛ можно измерить любыми подходящими способами, например, путем измерения ЭЭТоза *in vitro* (Fukuchi *et al.*, “How to detect eosinophil ETosis (EETosis) and extracellular traps”; Allergology International, Volume
25 70, Issue 1, 2021, Pages 19-29).

Термины «активность связывания» и «аффинность связывания» предназначены для обозначения тенденции молекулы антитела связываться или не связываться с мишенью. Аффинность связывания может быть определена количественно путем определения константы диссоциации (Kd) для антитела и его
30 мишени. Точно так же специфичность связывания антитела с его мишенью может быть определена исходя из результатов сравнения константы диссоциации (Kd) антитела и его мишени с константой диссоциации антитела и другой, нецелевой молекулы.

Обычно величина K_d антитела и мишени будет в 2 раза, предпочтительно в 5 раз, более предпочтительно в 10 раз меньше, чем K_d антитела и другой, нецелевой молекулы, например, неродственного или сопутствующего материала, находящегося в окружающей среде. Более предпочтительно, чтобы величина K_d антитела и мишени была в 50 раз меньше, еще более предпочтительно в 100 раз меньше и еще более предпочтительно в 200 раз меньше.

Величина этой константы диссоциации может быть определена непосредственно с помощью хорошо известных способов и может быть вычислена даже для сложных смесей с помощью таких способов, как, например, способ, описанный Casesi M.S. и Cacheris W.P. (1984, *Byte*, 9, 340-362). Например, величина K_d может быть установлена с помощью способа связывания на нитроцеллюлозных фильтрах с применением двух фильтров, описанного Wong I. и Lohman T.M. (1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 5428-5432), или, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса на основе Octet-платформы.

Одним из способов оценки аффинности связывания с дезиминированным гистонем 2A и/или гистонем 4 человека является ИФА. В данной области техники известны другие стандартные способы анализа для оценки связывающей способности лигандов, например, антител по отношению к мишеням; эти способы включают, например, вестерн-блоттинг, радиоиммунный анализ (РИА) и проточную цитометрию. Кинетику связывания (например, аффинность связывания) антитела также можно оценить с помощью стандартных видов анализа, известных в данной области техники, таких как поверхностный плазмонный резонанс, например, в аналитической системе *Viacore*TM.

Антитело предпочтительно имеет аффинность связывания с дезиминированным гистонем 2A и/или гистонем 4 человека, равную 1 нМ или менее. Предпочтительно антитело по изобретению имеет аффинность связывания с дезиминированным гистонем 2A и/или гистонем 4 человека и/или дезиминированным гистонем H3 человека, равную 0,5 нМ или менее, 0,1 нМ или менее, 50 пМ или менее, 10 пМ или менее, 5 пМ или менее, 2 пМ или менее или 1 пМ или менее.

Антитело или его связывающий фрагмент также могут быть химерным белком, содержащим антигенсвязывающий домен нативного антитела, или аптамером, таким как аптамер в форме ДНК или РНК.

Предпочтительно антитело представляет собой моноклональное антитело. Моноклональные антитела — это молекулы иммуноглобулинов, которые идентичны друг другу и имеют единую специфичность связывания и одинаковую аффинность к определенному эпитопу. Моноклональные антитела (мАТ) по настоящему
5 изобретению могут быть получены различными способами, включая общепринятую методологию по получению моноклональных антител, например, описанную в следующих работах: «Monoclonal Antibodies: a manual of techniques» (Zola H, 1987, CRC Press) и «Monoclonal Hybridoma Antibodies: techniques and applications» (Hurrell JGR, 1982 CRC Press).

10 Антитело или его связывающий фрагмент, применяемые в способах по настоящему изобретению, содержат связывающий домен. Связывающий домен обычно содержит 6 участков CDR (3 в случае V_HH), три из тяжелой цепи и три из легкой цепи. В одном из вариантов реализации CDR расположены в каркасе и вместе образуют вариабельную область или домен. Таким образом, в одном из вариантов
15 реализации антитело или связывающий фрагмент содержит связывающий домен, специфичный для антигена, содержащий вариабельную область или домен легкой цепи и вариабельную область или домен тяжелой цепи.

Остатки в вариабельных доменах антител принято нумеровать согласно IMGT (<http://www.imgt.org>). Эта система описана Lefranc M.P. (1997, J, Immunol. Today, 18, 509). Данная система нумерации используется в настоящем описании
20 изобретения, если не указано иное.

IMGT-обозначения остатков не всегда прямо соответствуют линейной нумерации аминокислотных остатков. Фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньше или больше аминокислот, чем
25 обозначено в строгой нумерации IMGT, что соответствует укорочению структурного компонента или вставке в структурный компонент, будь то каркас или CDR, базовой структуры вариабельного домена. Корректная IMGT-нумерация остатков может быть определена для данного антитела путем выравнивания гомологичных остатков последовательности антитела со «стандартной» последовательностью, имеющей
30 IMGT-нумерацию.

CDR вариабельного домена тяжелой цепи в соответствии с системой нумерации IMGT расположены в остатках 27–38 (CDR1 V_H), остатках 56–65 (CDR2 V_H) и остатках 105–117 (CDR3 V_H).

CDR переменного домена легкой цепи в соответствии с системой нумерации IMGT расположены в остатках 27–38 (CDR1 VL), остатках 56–65 (CDR2 VL) и остатках 105–117 (CDR3 VL).

5 Подходящие антитела или их связывающие фрагменты могут быть описаны в данной заявке по первичным аминокислотным последовательностям их CDR тяжелой и легкой цепей, их переменным областям тяжелой и легкой цепей и/или их полноразмерным тяжелым и легким цепям.

Предпочтительное антитело или его связывающий фрагмент для применения в способах по изобретению содержат модифицированный CDR1 VL антитела или его связывающего фрагмента, которые специфично связываются с цитруллинированным эпитопом на дезиминированном гистоне 2A и/или гистоне 4 человека, при этом модифицированный CDR1 VL обеспечивает улучшенные свойства антитела или его связывающего фрагмента по сравнению с антителом или его связывающим фрагментом, содержащими немодифицированную версию CDR1 15 VL. Немодифицированный CDR1 VL содержит аминокислотные последовательности или состоит из аминокислотных последовательностей: QSLLDSDGKTY (SEQ ID NO: 36) или QSLVDSGKTY (SEQ ID NO: 37). Соответственно, антитело или его связывающий фрагмент для применения в способах по настоящему изобретению предпочтительно не включают CDR1 VL с 20 последовательностью SEQ ID NO: 36 или 37, но антитело, содержащее такой CDR1 VL, все еще подходит для такого применения.

Модифицированный CDR1 VL-цепи антитела или его связывающего фрагмента может содержать аминокислотную последовательность или состоять из аминокислотной последовательности QSL-X₁-D-X₂-D-X₃-KTY, где X₁ представляет 25 собой V или L, X₂ представляет собой T, S, A или N и X₃ представляет собой G или A, при условии, что аминокислотная последовательность не является последовательностью QSLLDSDGKTY (SEQ ID NO: 36) или QSLVDSGKTY (SEQ ID NO: 37). Модифицированный CDR1 VL-цепи антитела или его связывающего фрагмента демонстрирует пониженную изомеризацию по сравнению с немодифицированным CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 36 или 37, но 30 сохраняет связывающие свойства немодифицированного CDR1.

Аминокислотные последовательности CDR для VH конкретного антитела или его связывающего фрагмента показаны в SEQ ID NO: 1, 2 и 3. CDR 2 и 3 для VL показаны в SEQ ID NO: 4 и 5.

Аминокислотные последовательности VH и VL конкретного антитела или его связывающего фрагмента даны в SEQ ID NO: 11 и 13. CDR для VH показаны в SEQ ID NO: 1, 2 и 3. CDR для VL показаны в SEQ ID NO: 6, 4 и 5.

5 Аминокислотные последовательности VH и VL еще одного антитела или его связывающего фрагмента даны в SEQ ID NO: 11 и 14. CDR для VH показаны в SEQ ID NO: 1, 2 и 3. CDR для VL показаны в SEQ ID NO: 7, 4 и 5.

Аминокислотные последовательности VH и VL еще одного антитела или его связывающего фрагмента даны в SEQ ID NO: 11 и 15. CDR для VH показаны в SEQ ID NO: 1, 2 и 3. CDR для VL показаны в SEQ ID NO: 8, 4 и 5.

10 Аминокислотные последовательности VH и VL еще одного антитела или его связывающего фрагмента даны в SEQ ID NO: 11 и 16. CDR для VH показаны в SEQ ID NO: 1, 2 и 3. CDR для VL показаны в SEQ ID NO: 9, 4 и 5.

Аминокислотные последовательности VH и VL еще одного антитела или его связывающего фрагмента даны в SEQ ID NO: 11 и 17. CDR для VH показаны в
15 SEQ ID NO: 1, 2 и 3. CDR для VL показаны в SEQ ID NO: 10, 4 и 5.

Аминокислотные последовательности VH и VL еще одного антитела или его связывающего фрагмента даны в SEQ ID NO: 12 и 13. CDR для VH показаны в SEQ ID NO: 1, 2 и 3. CDR для VL показаны в SEQ ID NO: 6, 4 и 5.

20 Аминокислотные последовательности VH и VL еще одного антитела или его связывающего фрагмента даны в SEQ ID NO: 12 и 14. CDR для VH показаны в SEQ ID NO: 1, 2 и 3. CDR для VL показаны в SEQ ID NO: 7, 4 и 5.

Аминокислотные последовательности VH и VL еще одного антитела или его связывающего фрагмента даны в SEQ ID NO: 12 и 15. CDR для VH показаны в SEQ ID NO: 1, 2 и 3. CDR для VL-цепи показаны в SEQ ID NO: 8, 4 и 5.

25 Аминокислотные последовательности VH и VL еще одного антитела или его связывающего фрагмента даны в SEQ ID NO: 12 и 16. CDR для VH показаны в SEQ ID NO: 1, 2 и 3. CDR для VL показаны в SEQ ID NO: 9, 4 и 5.

Аминокислотные последовательности VH и VL еще одного антитела или его связывающего фрагмента даны в SEQ ID NO: 12 и 17. CDR для VH показаны в
30 SEQ ID NO: 1, 2 и 3. CDR для VL показаны в SEQ ID NO: 10, 4 и 5.

Антитело может содержать аминокислотную последовательность
вариабельного домена тяжелой цепи, показанную в SEQ ID NO: 11, аминокислотную
последовательность вариабельного домена легкой цепи, показанную в SEQ ID NO:
16, аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи,

содержащую SEQ ID NO: 23 или 56, и аминокислотную последовательность константной области легкой цепи, показанную в SEQ ID NO: 24.

Антитело может содержать аминокислотную последовательность
5
вариабельного домена тяжелой цепи, показанную в SEQ ID NO: 11, аминокислотную
последовательность вариабельного домена легкой цепи, показанную в SEQ ID NO:
16, аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи,
показанную в SEQ ID NO: 23 или 56, и аминокислотную последовательность
константной области легкой цепи, показанную в SEQ ID NO: 24.

Антитело или его связывающий фрагмент могут содержать одну или более
10
последовательностей CDR любого из специфических антител, описанных выше, за
исключением того, что CDR1 VL всегда либо содержит аминокислотную
последовательность, либо состоит из аминокислотной последовательности QSL-X₁-
D-X₂-D-X₃-KTY, где X₁ представляет собой V или L, X₂ представляет собой T, S, A
или N и X₃ представляет собой G или A, при условии, что аминокислотная
15
последовательность не является QSLDSDGKTY (SEQ ID NO: 36) или
QSLVSDGKTY (SEQ ID NO: 37), или либо содержит, либо состоит из SEQ ID NO:
6, 7, 8, 9 или 10.

Антитело или его связывающий фрагмент могут содержать одну или более
последовательностей CDR VH и альтернативно или дополнительно одну или более
20
последовательностей CDR VL указанного специфического антитела в дополнение к
CDR1 VL. Антитело или его связывающий фрагмент могут содержать одну, две или
все три последовательности CDR VH специфического антитела или его
связывающего фрагмента, описанных выше, и альтернативно или дополнительно
одну, две или все три последовательности CDR VL-цепи указанного специфического
25
антитела или его связывающего фрагмента, включая CDR1 VL. Антитело или его
связывающий фрагмент могут содержать все шесть последовательностей CDR
специфического антитела или связывающего фрагмента, описанных выше. В
качестве примера: антитело может содержать одну из последовательностей
SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9 или 10 и одну или несколько из последовательностей
30
SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 и 5.

Модифицированный CDR1 VL-цепи антитела или его связывающего
фрагмента может содержать аминокислотную последовательность или состоять из
аминокислотной последовательности QSL-Z₁-Z₂-Z₃-Z₄-Z₅-KTY, где Z₁ представляет
собой V или L, Z₂ представляет собой D или E, Z₃ представляет собой T, S, A или N,

Z₄ представляет собой D, E, S или A и Z₅ представляет собой G или A, при условии, что аминокислотная последовательность не является последовательностью QSLLDSDGKTY (SEQ ID NO: 36) или QSLVDSGKTY (SEQ ID NO: 37).

Модифицированный CDR1 VL-цепи антитела или его связывающего фрагмента по изобретению демонстрирует пониженную изомеризацию по сравнению с немодифицированным CDR1 с последовательностью SEQ ID NO: 36 или 37, но сохраняет связывающие свойства немодифицированного CDR1.

Модифицированный CDR1 VL-цепи антитела или его связывающего фрагмента по изобретению может содержать последовательность или состоять из последовательности SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 или 52. Указанное антитело может содержать одну из последовательностей SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 или 52 и одну или более из последовательностей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 и 5. Антитело может содержать одну из последовательностей SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 или 52 и все последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 и 5.

Антитело или его связывающий фрагмент, подходящие для применения в способах по изобретению, могут альтернативно содержать вариант последовательности одного из этих переменных доменов или CDR тяжелой цепи в CDR2 или 3 в VL. Например, вариант может представлять собой вариант любой из вышеуказанных аминокислотных последовательностей с заменой, делецией или добавлением.

Вариант антитела может содержать 1, 2, 3, 4, 5, до 10, до 20, до 30 или более аминокислотных замен и/или делеций в конкретных последовательностях и фрагментах, обсуждавшихся выше, при сохранении активности антител, описанных в настоящей заявке. Варианты с «делецией» могут содержать делецию, например, 1, 2, 3, 4 или 5 отдельных аминокислот или одной или более небольших групп аминокислот, например, из 2, 3, 4 или 5 аминокислот. «Небольшие группы аминокислот» могут быть определены как аминокислоты, расположенные последовательно или находящиеся в непосредственной близости, но не последовательно по отношению друг к другу. Варианты с «заменой» предпочтительно включают замену одной или более аминокислот на то же количество аминокислот и выполнение консервативных аминокислотных замен. Например, аминокислота может быть заменена альтернативной аминокислотой, имеющей аналогичные свойства, например, другой основной аминокислотой, другой

кислой аминокислотой, другой нейтральной аминокислотой, другой заряженной аминокислотой, другой гидрофильной аминокислотой, другой гидрофобной аминокислотой, другой полярной аминокислотой, другой ароматической аминокислотой, другой алифатической аминокислотой, другой очень маленькой аминокислотой, другой малой аминокислотой или другой большой аминокислотой.

Ниже представлены некоторые свойства 20 главных аминокислот, которые можно использовать для выбора подходящих заместителей:

Ala	алифатическая, гидрофобная, нейтральная	Met	гидрофобная, нейтральная
Cys	полярная, гидрофобная, нейтральная	Asn	полярная, гидрофильная, нейтральная
Asp	полярная, гидрофильная, заряженная (-)	Pro	гидрофобная, нейтральная
Glu	полярная, гидрофильная, заряженная (-)	Gln	полярная, гидрофильная, нейтральная
Phe	ароматическая, гидрофобная, нейтральная	Arg	полярная, гидрофильная, заряженная (+)
Gly	алифатическая, нейтральная	Ser	полярная, гидрофильная, нейтральная
His	ароматическая, полярная, гидрофильная, заряженная (+)	Thr	полярная, гидрофильная, нейтральная
Ile	алифатическая, гидрофобная, нейтральная	Val	алифатическая, гидрофобная, нейтральная
Lys	полярная, гидрофильная, заряженная (+)	Trp	ароматическая, гидрофобная, нейтральная
Leu	алифатическая, гидрофобная, нейтральная	Tyr	ароматическая, полярная, гидрофобная

Предпочтительные «производные» или «варианты» включают те, в которых в последовательности вместо встречающейся в природе аминокислоты находится ее структурный аналог. Аминокислоты, применяемые в последовательностях, также могут быть получены как производные или модифицированы, например, помечены, при условии, что функция антитела не подвергается значительному неблагоприятному изменению.

Производные и варианты, описанные выше, могут быть получены во время синтеза антитела или путем модификации после получения, или, когда антитело находится в рекомбинантной форме, с применением известных методик сайт-направленного мутагенеза, случайного мутагенеза или ферментативного расщепления и/или лигирования нуклеиновых кислот.

Предпочтительно варианты антитела имеют аминокислотную последовательность, которая имеет более 60% или более 70%, например 75 или 80%, предпочтительно более 85%, например, более 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотной идентичности с VL и/или VH или их фрагментами, принадлежащими антителу, описанному в настоящей заявке. Этот уровень аминокислотной идентичности может прослеживаться по всей длине соответствующей последовательности SEQ ID NO или в части последовательности, например на участке, содержащем 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200 или более аминокислот, в зависимости от размера полноразмерного полипептида.

Предпочтительно варианты антитела содержат одну или более последовательностей CDR, описанных в настоящей заявке.

В отношении аминокислотных последовательностей выражение «идентичность последовательностей» означает последовательности, параметры которых соответствуют указанным значениям при их оценке с использованием программы ClustalW (Thompson JD *et al.*, 1994, Nucleic Acid Res., 22, 4673-4680); это следующие параметры:

параметры, определяемые методом попарного выравнивания: метод — медленный/точный, матрица — PAM; штраф за внесение пропуска (гэпа) — 10,00; штраф за расширение пропуска (гэпа) — 0,10;

параметры множественного выравнивания: матрица — PAM; штраф за внесение пропуска (гэпа) — 10,00; % идентичности для отсрочки — 30; штраф за пропуски на концах — включен; минимальное расстояние между пропусками — 0; отрицательно определенная матрица — нет; штраф за расширение пропуска (гэпа) — 0,20; штрафы за пропуски, зависящие от аминокислотных остатков — включены;

штрафы за пропуски в серии остатков гидрофильных аминокислот — включены; остатки гидрофильных аминокислот — G, P, S, N, D, Q, E, K, R. Подразумевается, что идентичность последовательности по конкретному остатку включает идентичные остатки, которые были просто получены как производные.

В способах по настоящему изобретению могут применяться антитела, имеющие специфические аминокислотные последовательности VH и VL, а также их варианты и фрагменты, которые сохраняют функцию или активность этих VH и VL.

Соответственно, в способах по настоящему изобретению могут применяться антитела или их связывающие фрагменты, содержащие варианты VH, которые сохраняют способность специфично связываться с цитруллинированным эпитопом

на дезиминированном гистоне 2А и/или гистоне 4 человека. Вариант тяжелой цепи может иметь по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности по

5 аминокислотной последовательности с немодифицированным VH. Вариант VH может содержать фрагмент по меньшей мере из 7 аминокислот, присутствующий в hVH22.101f или hVH22.101HC9 (SEQ ID NO: 11 и 12 соответственно), при этом антитело или его связывающий фрагмент сохраняют специфичную

10 реакционную способность в отношении цитруллинированного эпитопа на дезиминированном гистоне 2А и/или гистоне 4 человека; либо вариант hVH22.101f или hVH22.101HC9 (SEQ ID NO: 11 и 12 соответственно), имеющий по меньшей мере 70% идентичности по аминокислотной последовательности с

15 последовательностью hVH22.101f или hVH22.101HC9 (SEQ ID NO: 11 и 12 соответственно), при этом антитело или его связывающий фрагмент сохраняют специфичную реакционную способность в отношении цитруллинированного эпитопа на дезиминированном гистоне 2А и/или гистоне 4 человека.

Примеры антител, которые связываются с цитруллинированными эпитопами на дезиминированном гистоне 2А и гистоне 4 человека, описаны, например, в WO2009147201, WO2011070172, WO2016092082 и WO2020038963. Каждый из этих

20 документов и антитела, раскрытые в них (включая все последовательности CDR, последовательности переменных областей и последовательности константных областей как тяжелой, так и легкой цепей), включены в настоящую заявку посредством ссылки. В частности, каждое из антител, обозначенных RhmAb2.102, RhmAb2.108, RhmAb2.109, RhmAb2.110, RhmAb2.111 RhmAb2.112, MQ22.101,

25 MQ22.102 и MQ22.101b/d в WO2016092082, и любой их антигенсвязывающий фрагмент включены посредством ссылки. Аналогичным образом, каждое из антител, описанных с идентификаторами формата hMQ22.101x/y в WO2020038963, и любой их антигенсвязывающий фрагмент включены в настоящую заявку посредством ссылки. Антитела, описанные в WO2020038963, особенно

30 предпочтительны и более подробно обсуждаются ниже. Антитело, указанное в WO2020038963 как hMQ22.101f/LC41, является наиболее предпочтительным. Это антитело может быть описано в настоящей заявке как CIT-013.

Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева

Настоящее изобретение также включает полинуклеотиды, векторы и экспрессионные векторы, кодирующие антитело или его связывающие фрагменты, описанные в данной заявке.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, которые
5 кодируют любое антитело или фрагмент, описанные в данной заявке. Термины «молекула нуклеиновой кислоты» и «полинуклеотид» используются в данной заявке как взаимозаменяемые и относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидам, либо рибонуклеотидам, или их аналогам. Неограничивающие примеры полинуклеотидов включают ген, фрагмент гена,
10 матричную РНК (мРНК), кДНК, геномную ДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенную ДНК любой последовательности, выделенную РНК любой последовательности, зонды нуклеиновых кислот и праймеры. Полинуклеотид может быть предоставлен в выделенной или очищенной форме.

Последовательность нуклеиновой кислоты, которая «кодирует» выбранный
15 полипептид, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется (в случае ДНК) и транслируется (в случае мРНК) в полипептид *in vivo*, когда находится под контролем соответствующих регуляторных последовательностей. Границы кодирующей последовательности определяются стартовым кодоном на 5'- (амино-) конце и стоп-кодом остановки трансляции на
20 3'- (карбокси-) конце. Для целей настоящего раскрытия такие последовательности нуклеиновых кислот могут включать, без ограничений, кДНК, образованные с вирусной, прокариотической или эукариотической мРНК, геномные последовательности вирусной или прокариотической ДНК или РНК и даже синтетические последовательности ДНК. Последовательность терминации
25 транскрипции может быть расположена на 3'-конце относительно кодирующей последовательности. В одном варианте реализации полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует аминокислотную последовательность VH или VL, описанных выше. Полинуклеотид может кодировать последовательность VH или VL, относящихся к специфическому антителу или его связывающему
30 фрагменту, описанным в данной заявке.

Таким образом, антитело или его связывающий фрагмент можно продуцировать с полинуклеотида или доставлять в форме полинуклеотида, который его кодирует и способен его экспрессировать. Если антитело содержит две или более цепей, полинуклеотид может кодировать одну или несколько цепей антитела.

Например, полинуклеотид может кодировать легкую цепь антитела, тяжелую цепь антитела или обе цепи. Могут быть предложены два полинуклеотида, один из которых кодирует легкую цепь антитела, а другой кодирует соответствующую тяжелую цепь антитела. Такой полинуклеотид или пара полинуклеотидов могут экспрессироваться вместе таким образом, что образуется антитело.

Полинуклеотиды можно синтезировать способами, хорошо известными в данной области, как описано, например, в публикации Sambrook J *et al.* (1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*; Cold Spring Harbor: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут быть предложены в форме экспрессионной кассеты, которая содержит контрольные последовательности, функционально присоединенные к встроенной последовательности, что позволяет экспрессировать антитело по изобретению *in vivo*. Эти экспрессионные кассеты, в свою очередь, обычно содержатся в векторах (например, плазидах или рекомбинантных вирусных векторах). Такую экспрессионную кассету можно вводить непосредственно субъекту-хозяину. В качестве варианта, субъекту-хозяину можно вводить вектор, содержащий полинуклеотид. Предпочтительно полинуклеотид получают и/или вводят с применением генетического вектора. Подходящим вектором может быть любой вектор, который способен нести достаточное количество генетической информации и обеспечивать экспрессию полипептида, такого как антитело или его связывающий фрагмент, описанные выше.

Также раскрыты экспрессионные векторы, которые содержат такие полинуклеотидные последовательности. Такие экспрессионные векторы обычно конструируются методами молекулярной биологии и могут включать, например, плазмидную ДНК и соответствующие инициаторы, промоторы, энхансеры и другие необходимые элементы, такие как, например, сигналы полиаденилирования, расположенные в правильной ориентации, для обеспечения экспрессии пептида по изобретению. Специалисты в этой области могут применять и другие подходящие для этой цели векторы. В качестве дополнительного примера представлена ссылка на работу Sambrook J *et al.* (1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*; Cold Spring Harbor: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Специалисты в данной области могут применять последовательности, описанные в данной заявке, для клонирования или создания кДНК или геномных

последовательностей, например, таких, которые описаны в нижеприведенных примерах. Клонирование этих последовательностей в соответствующем эукариотическом экспрессионном векторе, таком как pcDNA3 (Invitrogen), или его дериватах и последующая трансфекция клеток млекопитающих (таких как клетки СНО) комбинациями подходящих векторов, содержащих легкие и тяжелые цепи, приведет к экспрессии и секреции антител, описанных в данной заявке.

Специалисты в этой области могут также создать аналоги антител или их связывающих фрагментов, описанных в данной заявке, с применением специфичных связывающих доменов последовательностей антител и экспрессировать их в другом контексте, например, как полипептид, как химерный белок. Такой способ хорошо известен специалистам в данной области.

Также описаны клетки, которые были модифицированы для экспрессии антитела. Такие клетки включают транзистентные или предпочтительно стабильные линии клеток высших эукариот, такие как клетки млекопитающих или клетки насекомых, клетки низших эукариот, такие как дрожжевые клетки, или прокариотические клетки, такие как клетки бактерий. Конкретные примеры клеток, которые можно модифицировать путем введения векторов или экспрессионных каскад, кодирующих антитело по изобретению, включают клетки млекопитающих НЕК293, СНО, HeLa, NS0 и COS. Предпочтительно выбранная клеточная линия должна быть не только стабильной, но также обеспечивающей полное гликозилирование.

Такие клеточные линии можно культивировать с применением стандартных способов для получения антитела или его связывающего фрагмента, либо их можно применять для доставки субъекту антител или их связывающих фрагментов в терапевтических или профилактических целях. Альтернативно, полинуклеотиды, экспрессионные каскады или векторы по изобретению можно вводить в клетки, взятые у субъекта, *ex vivo*, а затем возвращать клетку в организм субъекта.

В настоящей заявке описан способ получения антитела или его связывающего фрагмента, которые специфично связываются с цитруллинированным эпитопом на дезиминированном гистоне 2А и/или гистоне 4 человека, включающий культивирование клеток-хозяев, описанных в настоящей заявке, и выделение из этих клеток антитела или связывающего фрагмента.

Фармацевтические композиции

При применении в способах по настоящему изобретению антитело или связывающий фрагмент, описанные выше, могут быть предложены в виде фармацевтической композиции, содержащей антитело или его связывающий фрагмент. Таким образом, изобретение включает фармацевтические композиции, содержащие антитела или их связывающие фрагменты и фармацевтически приемлемый носитель, для применения в способах по изобретению.

Используемый в настоящей заявке термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и т. п., которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель подходит для парентерального введения, например, внутривенного, внутриглазного, внутримышечного, подкожного, интрадермального или внутрибрюшинного введения (например, путем инъекции или инфузии). В определенных вариантах реализации изобретения фармацевтически приемлемый носитель включает по меньшей мере один носитель, выбранный из группы, состоящей из раствора с соразтворителями, липосом, мицелл, жидких кристаллов, нанокристаллов, наночастиц, эмульсий, микрочастиц, микросфер, наносфер, нанокapsул, полимеров или полимерных носителей, поверхностно-активных веществ, суспендирующих агентов, комплексообразующих агентов, таких как циклодекстрины, или адсорбирующих молекул, таких как альбумин, поверхностно-активных частиц и хелатирующих агентов. В дополнительных вариантах реализации изобретения полисахарид включает гиалуроновую кислоту и ее производные, декстран и его производные, целлюлозу и ее производные (например, метилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, фталат ацетата целлюлозы, сукцинат ацетата целлюлозы, бутират ацетата целлюлозы; фталат гидроксипропилметилцеллюлозы), хитозан и его производные, [бета]-глюкан, арабиноксиланы, каррагинаны, пектин, гликоген, фукоидан, хондроитин, дерматан, гепаран, гепарин, пентозан, кератан, альгинат, циклодекстрины, а также их соли и производные, включая их сложные эфиры и сульфаты.

Предпочтительные фармацевтически приемлемые носители включают водные носители или разбавители. Примеры подходящих водных носителей, которые можно применять в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают воду, забуференную воду и физиологический раствор.

Примеры других носителей включают этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические сложные эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за
5 счет применения материалов для покрытия, например, лецитина, а также путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и за счет применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннитол и сорбитол, или хлорид натрия.

10 Фармацевтическая композиция может содержать фармацевтически приемлемый антиоксидант. Эти композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение заражения микроорганизмами можно
15 осуществлять как с помощью способов стерилизации (см. выше), так и путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты и т. п. Также может быть желательно включить в композиции изотонические агенты, такие как сахара, хлорид натрия и т. п. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекционных
20 лекарственных форм может быть обеспечена включением агентов, задерживающих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Терапевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой
25 упорядоченной структуры, подходящей для содержания высокой концентрации лекарственного средства.

Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного агента (например, антитела) в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним из перечисленных выше ингредиентов или
30 их комбинацией; при необходимости далее проводится стерилизация микрофильтрацией. Обычно дисперсии готовят путем включения активного агента в стерильный носитель, который содержит базовую диспергирующую среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными
способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка

(лиофилизация), с помощью которых можно получить порошок активного агента вместе с любым дополнительным требуемым ингредиентом из их предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

5 Фармацевтические композиции могут содержать дополнительные активные ингредиенты, а также антитело, описанное выше. Как упоминалось выше, композиции по изобретению могут содержать одно или более антител. Они также могут содержать дополнительные терапевтические или профилактические активные агенты.

10 В зависимости от пути введения антитело или его связывающий фрагмент могут быть покрыты материалом для защиты антитела от воздействия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать или денатурировать антитело.

15 В предпочтительном варианте реализации фармацевтическая композиция по изобретению представлена в форме, выбранной из группы, состоящей из водного раствора, геля, гидрогеля, пленки, пасты, крема, спрея, мази или обертывания.

20 В других вариантах реализации изобретения фармацевтические композиции, описанные в настоящей заявке, можно вводить следующими путями: внутривенным, подкожным, внутриглазным, внутримышечным, внутрисуставным, интрадермальным, внутрибрюшинным, интраспинальным или другими парентеральными путями введения, например, посредством инъекции или инфузии. Введение композиции может быть ректальным, пероральным, внутриглазным, топическим, эпидермальным или через слизистые оболочки. Введение может быть местным, в том числе путем ингаляции. В предпочтительном варианте реализации изобретения фармацевтическую композицию вводят внутривенно или подкожно.

25 Согласно одному из вариантов реализации фармацевтическую композицию можно вводить путем ингаляции. В одном варианте реализации применяют дозирующее устройство, содержащее фармацевтическую композицию.

30 В одном из вариантов реализации изобретения субъекта лечат как антителом или связывающим фрагментом по настоящему изобретению, так и кортикостероидом. В одном из вариантов реализации кортикостероид представляет собой дексаметазон. В одном из вариантов реализации антитело или связывающий фрагмент и кортикостероид вводят одновременно, отдельно или последовательно. В одном из вариантов реализации эти два вещества находятся в одной и той же композиции. Согласно другому варианту реализации они не находятся в одной и той

же композиции. В одном из вариантов реализации кортикостероид вводят путем ингаляции.

В данной заявке также предложены наборы, содержащие антитела или другие композиции по изобретению, а также инструкции по их применению. Набор может
5 дополнительно содержать один или более дополнительных реагентов, таких как дополнительный терапевтический или профилактический агент, как описывается в данной заявке.

Способы предотвращения и лечения заболевания

10 В настоящем изобретении предложен способ ингибирования образования эозинофильных внеклеточных ловушек (ЭВЛ), включающий введение антитела или его связывающего фрагмента, которые специфично связываются с
цитруллинированным эпитопом на дезиминированном гистоне 2А и/или гистоне 4
человека, в образец или субъекту, в которой или у которого присутствуют
15 эозинофилы. Настоящее изобретение также направлено на создание такого антитела или связывающего фрагмента для ингибирования образования нейтрофильных
внеклеточных ловушек (НВЛ), в частности, для лечения или предотвращения состояния легких. В одном предпочтительном варианте реализации состояние
легких характеризуется повышенным количеством нейтрофилов и эозинофилов.
20 Следовательно, в одном предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение применяют для ингибирования как ЭВЛ, так и НВЛ.

Способ может быть предназначен для предотвращения или лечения
заболевания или состояния у субъекта, и в этом случае способ включает введение
указанного антитела или его связывающего фрагмента субъекту в профилактически
25 или терапевтически эффективном количестве. Также предложено антитело или его связывающий фрагмент, которые специфично связываются с цитруллинированным
эпитопом на дезиминированном гистоне 2А и/или гистоне 4 человека, для
применения в указанном способе предотвращения или лечения заболевания или
состояния у субъекта. Также предложено антитело или его связывающий фрагмент,
30 которые специфично связываются с цитруллинированным эпитопом на
дезиминированном гистоне 2А и/или гистоне 4 человека, для применения при
производстве лекарственного средства для применения в указанном способе
предотвращения или лечения заболевания или состояния у субъекта.

В терапевтических применениях антитела или композиции вводят субъекту, уже страдающему от заболевания или состояния, в количестве, достаточном для излечения, облегчения или частичного прекращения состояния или одного или более из его симптомов. Такое терапевтическое лечение может привести к уменьшению степени тяжести симптомов заболевания или увеличению частоты или продолжительности периодов ремиссии. Достаточное для достижения вышеперечисленных эффектов количество определяется как «терапевтически эффективное количество». Эффективные количества для достижения данной цели будут зависеть от степени тяжести заболевания или вреда здоровью, а также от массы тела и общего состояния субъекта. При профилактическом применении полипептиды или композиции вводят субъекту, еще не имеющему симптомов нарушения или состояния, в количестве, достаточном для предотвращения или замедления развития симптомов. Такое количество определяется как «профилактически эффективное количество». Используемый в настоящей заявке термин «субъект» может обозначать любое позвоночное животное, как правило, любое млекопитающее, например, человека или лошадь. Предпочтительно субъект является человеком.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или его связывающий фрагмент могут быть соединены (напрямую или опосредованно) с другим фрагментом. Другой фрагмент может быть терапевтическим агентом, например, лекарственным средством. Другой фрагмент может представлять собой детектируемую метку. Другой фрагмент может быть связывающим фрагментом, таким как антитело или полипептидный связывающий домен, специфичный к терапевтической мишени. Антитело или его связывающий фрагмент по изобретению могут быть биспецифическим антителом.

Терапевтический агент или детектируемая метка могут быть присоединены напрямую, например, посредством химической конъюгации, к антителу или его связывающему фрагменту по изобретению. Способы конъюгирования агентов или меток с антителом хорошо известны специалистам в данной области. Например, карбодиимидная конъюгация (Bauminger S and Wilchek M, 1980, Methods Enzymol., 70, 151-159) может применяться для конъюгирования различных агентов, включая доксорубин, с антителами или пептидами. Водорастворимый карбодиимид (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC)) особенно полезен для

конъюгирования функционально активного фрагмента со связывающим фрагментом.

Также можно применять другие способы конъюгирования фрагментов с антителами. Например, можно применять окисление периодатом натрия с
5 последующим восстановительным алкилированием соответствующих реагентов, а также перекрестное сшивание с помощью глутаральдегида. Однако признано, что независимо от того, какой выбран способ получения конъюгата по изобретению, необходимо убедиться, что антитело сохраняет свою способность к нацеливанию и что функционально активный фрагмент сохраняет свою соответствующую функцию.

10 Терапевтический агент, связанный с антителом, может включать полипептид или полинуклеотид, кодирующий полипептид, оказывающий полезное терапевтическое действие. Примеры таких полипептидов включают антипролиферативные или противовоспалительные цитокины.

Антитело может быть связано с детектируемой меткой. Под «детектируемой
15 меткой» подразумевается, что антитело связано с фрагментом, который, будучи расположен в целевом участке после введения антитела пациенту, может быть обнаружен, обычно неинвазивным способом, извне тела и удаленно от места расположения целевого участка. Таким образом, антитело может быть полезно для визуализации и диагностики.

20 Обычно метка представляет собой или содержит радиоактивный атом, который полезен при визуализации. Подходящими радиоактивными атомами могут быть ^{99m}Tc и ^{123}I для скинтиграфических исследований. Другие метки включают, например, спиновые метки для магнитно-резонансной томографии (МРТ), такие как снова ^{123}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{19}F , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , гадолиний, марганец или железо. Понятно, что
25 с антителом должно быть связано количество соответствующих атомных изотопов, достаточное для того, чтобы молекулу можно было легко обнаружить.

Радиоактивные или другие метки могут быть включены известными в этой области способами. Например, антитело или его фрагмент могут быть биосинтезированы или могут быть синтезированы путем химического
30 аминокислотного синтеза с применением подходящих прекурсоров аминокислот, включающих, например, фтор-19 вместо водорода. Такие метки, как ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{186}Rh , ^{188}Rh и ^{111}In , могут быть присоединены, например, через остатки цистеина в полипептидах. Иттрий-90 может быть присоединен через остаток лизина. Предпочтительно, чтобы детектируемая метка включала радиоактивный атом, такой

как, например, технеций-99m или йод-123. Альтернативно, детектируемая метка может быть выбрана из группы, включающей: йод-123; йод-131; индий-111; фтор-19; углерод-13; азот-15; кислород-17; гадолиний; марганец; железо.

5 В одном из вариантов реализации антитело по изобретению способно селективно связываться напрямую или опосредованно с цитотоксическим фрагментом или с детектируемой меткой. Таким образом, в этом варианте реализации антитело связано с фрагментом, который селективно связывается с другим соединением или компонентом, который является цитотоксичным или легко обнаруживаемым.

10 Антитело или связывающий фрагмент, или композицию, содержащую указанное антитело или фрагмент, можно вводить одним или более путями введения с применением одного или более способов, известных специалистам в данной области. Как будет понятно специалисту в этой области, путь и/или способ введения будут варьироваться в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные
15 пути введения антител или композиций по изобретению включают внутривенный, подкожный, внутриглазной, внутримышечный, интрадермальный, внутрибрюшинный, интраспинальный или другие парентеральные пути введения, например, посредством инъекции или инфузии. Фраза «парентеральное введение» в контексте настоящего описания означает способы введения, отличные от
20 энтерального и топического введения, обычно посредством инъекции. Введение композиции может быть ректальным, пероральным, внутриглазным, топическим, эпидермальным или через слизистые оболочки. Введение может быть местным, включая введение периопухоловое, околоопухоловое и внутриопухоловое, на границе резекции опухолей, внутрь очага поражения, на периферии очага
25 поражения, путем внутривенной инфузии, а также может представлять собой внутривенное введение или введение путем ингаляции. В предпочтительном варианте реализации изобретения фармацевтическую композицию вводят внутривенно или подкожно.

30 Подходящая дозировка антитела или его связывающего фрагмента может быть определена квалифицированным практикующим медицинским работником. Фактические уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа у конкретного пациента без токсических эффектов при

применении конкретной композиции и способа введения. Выбранный уровень дозы будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретного применяемого антитела, путь введения, время введения, скорость выведения антитела, продолжительность лечения, использование других

5 лекарственных средств, соединений и/или материалов в комбинации с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, массу тела, состояние, общее состояние здоровья и предыдущую медицинскую историю болезней пациента, получающего лечение, а также другие подобные факторы, хорошо известные специалистам в области медицины.

10 Подходящая доза антитела или его связывающего фрагмента может находиться, например, в диапазоне от приблизительно 0,1 мкг/кг до приблизительно 100 мг/кг массы тела пациента, получающего лечение. Например, подходящая доза может составлять от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 50 мг/кг массы

15 тела в неделю, от приблизительно 100 мкг/кг до приблизительно 25 мг/кг массы тела в неделю или от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 12,5 мг/кг массы тела в неделю.

Подходящая доза может составлять от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 50 мг/кг массы тела в день, от приблизительно 100 мкг/кг до приблизительно 25 мг/кг массы тела в день или от приблизительно 10 мкг/кг до

20 приблизительно 12,5 мг/кг массы тела в день.

Режимы дозирования могут быть скорректированы для обеспечения оптимального желаемого эффекта (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить один болюс, можно вводить несколько разделенных доз с течением времени, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в

25 зависимости от требований терапевтической ситуации. Особенно удобно составлять парентеральные композиции в виде стандартных единиц дозирования для простоты введения и единообразия дозировки. Выражение «стандартная единица дозирования» в настоящей заявке обозначает физически дискретные единицы, подходящие в качестве единичных доз для проходящих лечение субъектов; каждая

30 единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем.

Антитела можно вводить в однократной дозе или в многократных дозах. Многократные дозы можно вводить одним и тем же или разными путями и в одно и

то же или разные места. Альтернативно, антитела можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением; в этом случае требуется менее частое введение.

Дозу и частоту введения можно варьировать в зависимости от периода полувыведения антитела у пациента и желательной продолжительности лечения.

- 5 Доза и частота введения также могут варьироваться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических применениях можно вводить относительно низкую дозу через относительно нечастые интервалы в течение длительного периода времени. В терапевтических применениях можно вводить относительно высокую дозу, например, до тех пор,
- 10 пока у пациента не будет наблюдаться частичное или полное исчезновение симптомов заболевания.

- Комбинированное введение двух или более агентов может быть достигнуто рядом различных способов. В одном из вариантов реализации антитело или его связывающий фрагмент и другой агент могут быть введены вместе в одной
- 15 композиции. В другом варианте реализации антитело и другой агент могут быть введены в отдельных композициях как часть комбинированной терапии. Например, антитело или его связывающий фрагмент могут быть введены до, после или одновременно с другим агентом.

20 **Заболевания, подлежащие диагностике, лечению или предотвращению**

- Способы, описанные в настоящей заявке, могут быть предназначены для диагностики, лечения или предотвращения любого заболевания или состояния, которое включает патологию, связанную с ЭВЛ. Патология, связанная с ЭВЛ, обычно означает патологию, которая опосредуется полностью или частично
- 25 образованием ЭВЛ. Такая патология обычно присутствует при любом заболевании или состоянии, которое опосредовано полностью или частично, или предпочтительно преимущественно опосредовано эозинофилами. Такие заболевания или состояния могут быть описаны в настоящей заявке как эозинофильные или связанные с эозинофилами. Следовательно, другими словами,
- 30 способы, описанные в настоящей заявке, могут быть предназначены для диагностики, лечения или предотвращения эозинофильного заболевания или состояния.

Эозинофильное заболевание или состояние может быть определено как заболевание или состояние, при котором эозинофилы присутствуют в повышенном

количестве в пораженной ткани или органе по сравнению с той же тканью или органом у здорового индивидуума. Эозинофильные заболевания и состояния могут включать: эозинофильное заболевание или состояние кожи; респираторное эозинофильное заболевание или состояние; желудочно-кишечное эозинофильное заболевание или состояние; аллергическое заболевание или состояние; или 5 гельминтную, грибковую, вирусную или бактериальную инфекцию.

Эозинофильные заболевания или состояния кожи включают буллезный пемфигоид (БП), атопический дерматит (АД) и хроническую спонтанную крапивницу (ХСС), аллергический контактный дерматит и эозинофильный целлюлит 10 (также называемый синдромом Уэллса).

Респираторные эозинофильные заболевания или состояния включают эозинофильную астму, полипы в носовой полости, хронический риносинусит с назальным полипозом (CRSwNP), аллергический синусит, аллергический ринит, аллергический бронхолегочный аспергиллез (грибковая инфекция), эозинофильный 15 хронический риносинусит, тропическую легочную эозинофилию (обычно респираторную гельминтную инфекцию).

Желудочно-кишечные эозинофильные заболевания или состояния включают эозинофильный эзофагит (ЕоЕ), эозинофильный гастрит (желудок — EG), эозинофильный гастроэнтерит (желудок и тонкая кишка — EGE), эозинофильный 20 энтерит (тонкая кишка), эозинофильный колит (толстая кишка — EC) и желудочно-кишечную гельминтную инфекцию, такую как аскаридоз или трихинеллез.

Другие эозинофильные заболевания или состояния включают гиперэозинофильный синдром (HES — поражает кровь и различные органы), эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (EGPA — поражает различные 25 органы, включая кровеносные сосуды) и эозинофильный средний отит (EOM — поражает среднее ухо), а также лекарственную реакцию с эозинофильными и системными симптомами (DRESS — поражает различные органы).

В одном предпочтительном варианте реализации заболевание, подлежащее лечению или предотвращению, представляет собой артериосклероз. В другом 30 варианте реализации настоящего изобретения лечат васкулит.

Способы, описанные в настоящей заявке, могут применяться для диагностики, лечения или предотвращения любого из перечисленных выше эозинофильных заболеваний или состояний. Особенно предпочтительные эозинофильные заболевания или состояния включают те, при которых наличие ЭВЛ

было напрямую подтверждено. Такие заболевания и состояния включают, без ограничений: буллезный пемфигоид, атопический дерматит, аллергический контактный дерматит, эозинофильную астму, хронический риносинусит с назальным полипозом (CRSwNP), аллергический синусит, аллергический бронхолегочный аспергиллез, эозинофильный хронический риносинусит, эозинофильный эзофагит (ЕоЕ), гиперэозинофильный синдром (HES), эозинофильный гранулематоз с полиангиитом (EGPA), эозинофильный средний отит (EOM) и лекарственную реакцию с эозинофильными и системными симптомами (DRESS).

Наиболее предпочтительными эозинофильными заболеваниями или состояниями являются те, при которых непосредственно наблюдали корреляцию между ЭВЛ и частотой возникновения и/или степенью тяжести заболевания. Такие заболевания и состояния включают, без ограничений: эозинофильную астму, хронический риносинусит с назальным полипозом (CRSwNP), эозинофильный хронический риносинусит и эозинофильный средний отит (EOM).

Присутствие ЭВЛ и/или роль эозинофилов при заболеваниях, подобных обсуждаемым выше, надежно подтверждено в данной области техники. См., например, публикации: Williams, T. L *et al.* (2020). "NETs and EETs, a Whole Web of Mess". *Microorganisms*, 8(12), 1925 и Mukherjee, M., *et al.* (2018). Eosinophil Extracellular Traps and Inflammatory Pathologies-Untangling the Web!. *Frontiers in immunology*, 9, 2763. Изобретение подходит для лечения, предотвращения или диагностики любого заболевания, указанного в этих документах, которые включены в настоящую заявку посредством ссылки.

Способы, описанные в настоящей заявке, также могут быть предназначены для диагностики, лечения или предотвращения патологии, связанной с ЭВЛ, при заболевании или состоянии, которые лишь частично опосредованы эозинофилами. Например, такие заболевания, как хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), болезнь Крона, язвенный колит, герпетиформный дерматит, тромбоз и атеросклероз, могут иметь множественные патологические проявления, вызванные несколькими типами клеток, и поэтому не могут быть определены как «эозинофильные». Тем не менее, они могут иметь патологическое проявление, связанное с ЭВЛ, и, таким образом, их можно диагностировать, лечить или предотвращать с помощью способов, описанных в настоящей заявке.

Альтернативные способы

В настоящем изобретении предложен способ ингибирования или обнаружения образования эозинофильных внеклеточных ловушек (ЭВЛ), включающий введение антитела или его связывающего фрагмента, которые специфично связываются с цитруллинированным эпитопом на дезиминированном гистоне 2А и/или гистоне 4 человека, в образец или субъекту, в которой или у которого присутствуют эозинофилы. Способ может быть предназначен для ингибирования *ex vivo* или обнаружения образования ЭВЛ в образце, и в этом случае способ включает введение указанного антитела или его связывающего фрагмента в образец и инкубирование в условиях, подходящих для связывания. Другими словами, условия позволяют образование комплекса антитело-мишень. Способ может необязательно включать определение того, сформировался ли указанный комплекс.

В таких способах образец приводят в контакт с подходящим антителом или фрагментом в условиях, подходящих для связывания. Подходящие условия включают инкубацию в течение по меньшей мере 1 минуты, 2 минут, 3 минут, 4 минут, 5 минут, 6 минут, 7 минут, 8 минут, 9 минут, 10 минут или более. Инкубацию предпочтительно проводят при комнатной температуре, более предпочтительно приблизительно при 20 °С, 25 °С, 30 °С, 35 °С, 40 °С или 45 °С и наиболее предпочтительно приблизительно при 37 °С. Способы, описанные выше, можно осуществлять при любом подходящем значении pH, но обычно при pH приблизительно от 6,5 до 7,5. Способ может быть осуществлен в любом подходящем буфере, таком как трис-буферный солевой раствор (TBS) или фосфатно-буферный солевой раствор (PBS).

Обнаружение или анализ образца для определения того, имело ли место связывание, можно проводить любым подходящим аналитическим методом, таким как, без ограничений, масс-спектрометрия, ВЭЖХ, аффинная хроматография, гель-электрофорез, ДСН-ПААГ, ИФА, лектиновый блоттинг, спектрометрия, капиллярный электрофорез, проточная цитометрия, микроскопия и другие стандартные лабораторные методики для анализа.

Антитело или его связывающий фрагмент могут быть связаны с твердой подложкой или могут быть помечены или конъюгированы с другой химической группой или молекулой, как описано выше, для облегчения обнаружения. Например, типичные химические группы включают флуоресцентные метки, такие

как флуоресцеинизотиоцианат (FITC) или фикоэритрин (PE), или метки, такие как биотин.

Образец, как правило, представляет собой образец биологической жидкости, полученной от субъекта, такой как сыворотка или кровь. Способ может включать

5 обработку образца перед введением антитела или фрагмента, например, путем выделения эозинофилов. Образец может представлять собой образец, взятый у субъекта, предпочтительно субъекта-человека, у которого можно подтвердить или заподозрить наличие патологии, связанной с ЭВЛ. Полученные результаты могут

10 применяться для диагностической цели, например, для выявления или подтверждения наличия патологии, связанной с ЭВЛ, у субъекта, включая, например, любое из заболеваний, перечисленных в предыдущем разделе. Такое применение может включать сравнение результатов, полученных от субъекта, с результатами, полученными с использованием контрольного образца, полученного от здорового субъекта. Наличие патологии, связанной с ЭВЛ, у субъекта может

15 быть подтверждено или заподозрено из-за наличия одного или более симптомов эозинофильного заболевания, включая любое эозинофильное заболевание, описанное в настоящей заявке.

Нарушения легких

20 В одном предпочтительном варианте реализации настоящее изобретение применяют для лечения нарушения (заболевания) легкого (легких). В частности, настоящее изобретение направлено на создание способа лечения или предотвращения нарушения легких, включающего введение антитела или его связывающего фрагмента, которые специфично связываются с цитруллинированным

25 эпитопом на дезиминированном гистоне 2А и/или гистоне 4 человека, субъекту, страдающему указанным нарушением легких или подверженному риску указанного нарушения легких. В одном варианте реализации изобретения антитело или связывающий фрагмент представляют собой любое из описанных в настоящей заявке. В предпочтительном варианте реализации нарушение легких может

30 представлять собой воспалительное нарушение легких. В одном из вариантов реализации нарушение легких характеризуется притоком воспалительных клеток в легкие по сравнению со здоровым субъектом без этого нарушения. Например, согласно одному варианту реализации указанное состояние может характеризоваться притоком лейкоцитов в легкое. В одном из вариантов реализации

нарушение легких характеризуется притоком гранулоцитов в легкое, в частности эозинофилов и/или нейтрофилов в легкое.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что антитело или его связывающий фрагмент, которые специфично связываются с цитруллинированным эпитопом на дезиминированном гистоне 2А и/или гистоне 4 человека, могут быть более эффективными в лечении заболевания легких, чем кортикостероид. Следовательно, согласно одному варианту реализации заболевание легких характеризуется тем, что субъект демонстрирует слабую реакцию симптомов на кортикостероиды. В частности, в одном из вариантов реализации предложенный подход применяют для лечения субъекта с заболеванием легких, демонстрирующим слабую реакцию на дексаметазон. В другом варианте реализации изобретения субъекта лечат как антителом или его связывающим фрагментом, которые специфично связываются с цитруллинированным эпитопом на дезиминированном гистоне 2А и/или гистоне 4 человека, так и также кортикостероидом. В одном из вариантов реализации субъекта лечат как антителом (или связывающим фрагментом), так и дексаметазоном. Согласно одному из вариантов реализации комбинация этих двух средств может способствовать усилению действия кортикостероида.

Согласно одному варианту реализации указанный способ лечения или предотвращения нарушения легких приводит к уменьшению присутствия НВЛ. Согласно другому варианту реализации указанный способ приводит к снижению присутствия ЭВЛ. В предпочтительном варианте реализации указанный способ может приводить к снижению как НВЛ, так и ЭВЛ в легких субъекта. В одном из вариантов реализации указанный способ приводит к снижению образования НВЛ и/или ЭВЛ.

Способы могут применяться для лечения любого подходящего нарушения легких, в частности воспалительного нарушения легких. В одном из вариантов реализации нарушение легких выбрано из ХОБЛ, бронхита, эмфиземы, муковисцидоза, фиброза и идиопатического фиброза легких и астмы. В предпочтительном варианте реализации состояние представляет собой астму. Возможно, у субъекта тяжелая астма. В одном особенно предпочтительном варианте реализации нарушение легких может представлять собой аллергическую астму. В одном предпочтительном варианте реализации нарушение легких представляет собой аллергическую астму, включающую аллергию на клещей

домашней пыли. В одном из вариантов реализации нарушение легких представляет собой астму, характеризующуюся наличием повышенного количества эозинофилов и/или нейтрофилов. В одном варианте реализации способ по настоящему изобретению может быть применен для лечения состояния легких с повышенным количеством инфильтрирующих эозинофилов. В другом варианте реализации способ по настоящему изобретению может быть применен для лечения состояния легких с повышенным количеством инфильтрирующих нейтрофилов. Согласно другому варианту реализации у субъекта увеличено количество инфильтрирующих эозинофилов и нейтрофилов. В одном варианте реализации у субъекта может быть нейтрофильная астма. Согласно другому варианту реализации у субъекта может быть эозинофильная астма. В одном варианте реализации у субъекта может быть астма 2-го типа. Согласно другому варианту реализации у субъекта может быть астма, не относящаяся ко 2-му типу.

В одном из вариантов реализации в качестве способа оценки наличия воспалительных клеток в легком можно применять бронхоальвеолярный лаваж (BAL). В одном варианте реализации BAL можно применять в качестве способа измерения общего количества лейкоцитов в бронхоальвеолярном пространстве. В одном из вариантов реализации BAL можно применять в качестве способа измерения количества нейтрофилов и/или эозинофилов в бронхоальвеолярном пространстве. В одном из вариантов реализации способ по настоящему изобретению приводит к снижению количества нейтрофилов в BAL от субъекта по сравнению с количеством до лечения. В другом варианте реализации лечение приведет к снижению количества эозинофилов в BAL от субъекта по сравнению с количеством до лечения или в течение курса лечения. Согласно одному варианту реализации будет снижено количество как эозинофилов, так и нейтрофилов. В одном из вариантов реализации общее количество гранулоцитов в BAL будет снижено в результате лечения. В одном из вариантов реализации изобретение может привести к уменьшению количества периваскулярных инфильтрирующих нейтрофилов, периваскулярных мононуклеарных клеток и/или бронхиолярных инфильтрирующих нейтрофилов. Лечение антителом или его связывающим фрагментом, описанными в настоящей заявке, также может привести к снижению уровня цитруллинированного гистона, например, согласно измерению в BAL, в частности, цитруллинированного гистона 3 в BAL.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать в качестве дополнительных ограничений. Содержание всех фигур и всех ссылок, патентов и опубликованных патентных заявок, процитированных в данной заявке, прямо включено в настоящую
5 заявку посредством ссылок.

Примеры

Пример 1. Ингибирование высвобождения внеклеточной ДНК из эозинофилов антителом С1Т-013 при стимуляции А23187 или РМА

10 Эозинофилы выделяли из 20 мл крови здоровых доноров с помощью градиентного центрифугирования с фиколлом, последующего лизиса эритроцитов с помощью буфера АСК и далее отрицательного отбора с использованием набора для выделения эозинофилов (Miltenyi Biotec) с магнитными гранулами в соответствии с протоколом производителя. Выделенные эозинофилы (~90% чистоты, определенной
15 на основе экспрессии CD16⁻, сиглек-8⁺, измеряемой с помощью проточной цитометрии) стимулировали 2 мкМ А23187 или 100 нМ форбол-12-миристат-13-ацетатом (РМА) в отсутствие или в присутствии С1Т-013 или антитела изотипического контроля (25 мкг/мл). В качестве отрицательного контроля клетки высевали без стимуляции или воздействия антител (без обработки). Краситель Sytox
20 Green, неспособный проникать в клетки, присутствовал во всех лунках для визуализации ДНК. Получали по четыре изображения на лунку для фазового контраста и красителя Sytox Green каждые 30 минут с использованием системы для визуализации и анализа живых клеток Incucyte SX1 (Sartorius). а) Для различных условий показано репрезентативное изображение, полученное после 4 часов
25 стимуляции. Зеленый сигнал красителя Sytox Green изображен в оттенках серого. Масштабные метки: 100 мкм б) Данные анализировали с использованием программного обеспечения Incucyte SX1 для внеклеточных ловушек. Эти внеклеточные ловушки определяли как сигнал Sytox Green с относительно низкой средней интенсивностью из-за расправления молекул ДНК (от 18 до 80) и
30 площадью, превышающей среднюю площадь клетки (площадь от 315 мкм² до 4000 мкм² на основе измерения выбранных случайным образом примеров изображений из эксперимента). Количество клеток в начале эксперимента определяли на фазово-контрастном изображении как явления с площадью более 70 мкм² (значение снова основано на оценке конкретного эксперимента). Результаты

выражены как относительное количество внеклеточных ловушек по сравнению с количеством клеток в начале. На графиках показано среднее значение и стандартное отклонение по трем лункам для каждого условия в динамике для эозинофилов, полученных от каждого донора ($n = 3$). Графики демонстрируют явное снижение процентной доли эозинофильных внеклеточных ловушек в присутствии СІТ-013 по сравнению с изотипическим контрольным антителом.

Пример 2. Влияние лечения антителом tАСРА на мышиную модель воспаления дыхательных путей

10 Самок мышей линии Balb/c (в возрасте 8 недель) сенсibilизировали клещом домашней пыли (HDM) и подкожно (п/к) вводили полный адъювант Фрейнда в день 0. HDM был получен от компании Stallergenes Greer (партия № XPB82D3 A2.5). Четырнадцать дней спустя мышам вводили HDM интраназально (и/н) или вводили носитель (мыши с имитацией лечения). За час до этого заражения мышам вводили дексаметазон перорально (п/о) в дозе 1 мг/кг, мышиный предшественник антитела 15 СІТ-013 (tАСРА; MQ22.101) внутривенно (в/в) в дозе 20 мг/кг или изотипическое контрольное антитело в/в в дозе 20 мг/кг. Не получавшим лечения мышам вводили носитель п/о или в/в. На день 15 у мышей проводили лаваж легких три раза с помощью 0,4 мл раствора PBS (не содержавшего Mg^{2+} и Ca^{2+}). Жидкость бронхоальвеолярного лаважа (BALF) центрифугировали 5 мин при $400 \times g$ и $4^\circ C$ для отделения клеток от бесклеточной фракции BALF.

После ресуспендирования клеточного осадка в PBS проводили подсчет клеток, результаты которого представлены на Фигуре 2, панели а и b. В частности, количество эозинофилов (панель а на Фигуре 2) и нейтрофилов (панель b на 25 Фигуре 2) в жидкости бронхоальвеолярного лаважа (BALF) подсчитывали с помощью автоматического счетчика клеток DASIT Sysmex XT-2000Iv. Данные показаны на Фигуре 2, панели а и b, как количество клеток на мышь с указанием среднего значения и стандартной ошибкой среднего (SEM) на группу (по 7–8 мышей в каждой группе). Выбросы, определенные тестом Граббса, были исключены. 30 Статистический анализ проводили с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом множественного сравнения по Даннетту для групп по сравнению с группой, которой вводили HDM, с соответствующим путем введения. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Результаты на Фигуре 2, панели а и b, показывают, что как антитело tАСРА, так и дексаметазон приводили к

уменьшению количества нейтрофилов и эозинофилов в BALF мышей, которым вводили HDM.

Затем бесклеточную фракцию BALF хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до дальнейшего использования для определения концентрации цитруллинированного гистона H3 (цитH3) с использованием набора для проведения ИФА цитруллинированного гистона H3 (клон 11D3) (Sanbio; 501620) в соответствии с протоколом производителя (см. также Cayman Chemical Citrullinated Histone H3 — Clone 11D3 — ELISA Kit, кат. № 501620, с информацией, доступной на сайте www.caymanchem.com). Полученные результаты показаны на Фигуре 2, панель с.

Выбросы, определенные тестом Граббса, были исключены. Статистический анализ проводили по критерию Краскала — Уоллеса с последующим тестом множественного сравнения по Даннетту для групп по сравнению с группой, которой вводили HDM, с соответствующим путем введения. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$. Как следует из Фигуры 2, панель с, как антитело tACPA, так и дексаметазон приводили к снижению уровня цитруллинированного гистона H3 у мышей, которым вводили HDM, вплоть до уровня или близко к уровню, наблюдаемому у контрольных мышей, которым вводили только носитель.

После лаважа ткани легкого собирали, фиксировали 10 % фосфатным буфером с формалином и заливали парафином. Были сделаны два продольных среза по 5 мкм на расстоянии 30 мкм друг от друга и окрашены гематоксилином и эозином. Срезы были оценены независимым патологом, который не имел информации о распределении в группы лечения. Левое и правое легкое оценивали по отдельности при увеличении $\times 80$ или $\times 160$ с использованием микроскопа Olympus BX50. Сначала была проведена общая оценка при увеличении $\times 80$, а увеличение $\times 160$ использовалось для подробного исследования с целью подтверждения степени тяжести. Полученные результаты показаны на Фигуре 2, панели d–f. На панели d показаны результаты для периваскулярной нейтрофилии, на панели e — результаты для инфильтрации периваскулярных мононуклеарных клеток и на панели f — результаты для бронхиолярной нейтрофилии. Результатам приписывали оценку 0 в случае нормы, 1 в случае минимальной очаговой инфильтрации, 2 в случае минимальной многоочаговой инфильтрации, 3 в случае умеренной инфильтрации и 4 в случае выраженной инфильтрации. Данные показаны на Фигуре 2, панели d–f, в виде средней оценки на мышь для двух срезов с указанием среднего значения + SEM на группу (по 8 мышей в группе). Статистический анализ проводили по критерию

Краскала — Уоллеса с последующим тестом множественного сравнения по Даннетту для групп по сравнению с группой, которой вводили HDM, с соответствующим путем введения. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Более подробно, оценка, используемая при анализе патологии легких, была следующей: 1. Был проведен предварительный скрининг всех срезов на качество. Частыми причинами отбраковки были: царапины или разрывы среза; подъем среза; некачественное окрашивание. 2. Были зарегистрированы агональные изменения. 3. Были оценены следующие гистологические результаты: **периваскулярная нейтрофильная инфильтрация; периваскулярная мононуклеарная клеточная инфильтрация** (определение: инфильтрация воспалительных клеток из просвета сосуда в стенку сосуда, включая клетки внешней эластичной пластинки); **бронхиолярная нейтрофильная инфильтрация.**

Результаты на Фигуре 2, панели d–f, показывают, что как антитело tACPA, так и дексаметазон приводили к снижению периваскулярной нейтрофилии (панель d), периваскулярных мононуклеарных клеток (панель e) и бронхиолярной нейтрофильной инфильтрации (панель f), причем результат для антитела tACPA был более выраженным в каждом случае по сравнению с наблюдаемым для дексаметазона.

20 **Пример 3. Влияние лечения антителом tACPA на мышиную модель воспаления дыхательных путей**

Самок мышей линии Balb/c (в возрасте 8 недель) сенсibilizировали 100 мкг клеща домашней пыли (HDM) и подкожно (п/к) вводили 25 мкг полного адьюванта Фрейнда в день 0. HDM был получен от компании Stallergenes Greer (партия № XPB82D3A2.5). Четырнадцать дней спустя мышам вводили 100 мкг HDM интраназально (и/н) или вводили носитель (мыши с имитацией лечения). За час до этого заражения мышам вводили дексаметазон (Sigma-Aldrich) перорально (п/о) в дозе 1 мг/кг, мышиный предшественник антитела CIT-013 (tACPA; MQ22.101) внутривенно (в/в) в дозе 20 мг/кг или изотипическое контрольное антитело (конт. АТ; антитело к лизоциму куриных яиц; CrownBio, кат. № C0005) в/в в дозе 20 мг/кг. Не получавшим лечения мышам вводили носитель п/о или в/в. На день 15 у мышей проводили лаваж легких три раза с помощью 0,4 мл раствора PBS (не содержавшего Mg^{2+} и Ca^{2+}). Жидкость бронхоальвеолярного лаважа (BALF) центрифугировали 5 мин при $400 \times g$ и $4^\circ C$ для отделения клеток от бесклеточной фракции BALF.

Бесклеточную фракцию BALF хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до дальнейшего использования. После лаважки ткани легкого собирали, фиксировали 10 % фосфатным буфером с формалином в течение 24 часов и заливали парафином для гистопатологических исследований.

5 Хранящийся BALF использовали для определения концентрации
двухцепочечной ДНК (дцДНК) с использованием наборов для анализа дцДНК Quant-
iT PicoGreen (ThermoFisher scientific; P11496) в соответствии с протоколом
производителя (см. также Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kits, кат. № P11496,
с информацией, доступной по адресу www.thermofisher.com). Вкратце, образцы
10 разбавляли в пять раз в буфере TE и смешивали 1 : 1 с двухсоткратным
разбавлением PicoGreen в буфере TE. Флуоресценцию измеряли на SpectraMax iD5
(Molecular Devices) или CLARIOstar (BMG Labtech). Полученные результаты
показаны на Фигуре 3, панель а.

Затем залитую парафином ткань легких использовали для подготовки
15 продольных срезов толщиной 5 мкм для окрашивания на автоматизированной
платформе для окрашивания Ventana Discovery Ultra (Ventana Medical Systems).
Срезы депарафинизировали, гидратировали и инкубировали в течение 32 минут при
93 °C в растворе Cell Conditioning 1 (Ventana Medical Systems) для восстановления
антигенов. Срезы окрашивали 20 мкг/мл кроличьего антитела к
20 цитруллинированному гистону 3 (цитH3; Abcam, кат. № ab5103) и 2 мкг/мл козьего
антитела к миелоидной пероксидазе (R&D systems, кат. № AF3667) в течение
60 минут. После промывки срезы инкубировали с вторичными антителами, 4 мкг/мл
ослиного антитела к кроличьему антителу, конъюгированного с Alexa Fluor 488
(Abcam, кат. № ab150073), и 4 мкг/мл ослиного антитела к козьему антителу,
25 конъюгированного с Alexa Fluor 555 (Abcam, кат. № 150134), в течение 32 минут при
37 °C. Затем срезы промывали и инкубировали с 300 нМ DAPI в течение 30 мин при
комнатной температуре для окрашивания ДНК. Окрашенные срезы были
отсканированы для получения цифрового изображения с использованием Zeiss Axio
Scan Z1 (Zeiss) и оценены независимым патологом, который не имел информации о
30 распределении в группы лечения. Скрининг для оценки качества срезов показал
неспецифическую аутофлуоресценцию в канале FITC цитH3. Количество
положительных сигналов цитруллинированных гистонов 3 (цитH3+) и количество
положительных сигналов MPO (MPO+) подсчитывали и отличали от сигнала
аутофлуоресценции на основании формы. Сигналы считали внеклеточными на

основании формы или в случае удаления от ближайшего ядра более чем на 3 радиуса ядра. Нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ) визуализировали как структуры, содержащие внеклеточные сигналы как цитНЗ, так и МРО, а частоту возникновения НВЛ оценивали от 0 до 3 (отрицательная, легкая, умеренная и тяжелая). Подсчеты проводили отдельно в каждой анатомической области. (Пери)васкулярная область состояла из стенки кровеносного сосуда до края внешней адвентиции кровеносных сосудов диаметром < 300 мкм. Когда край внешней адвентиции был нечетким, он был установлен на поперечном срезе на расстоянии, в три раза превышающем максимальную толщину стенки. (Пери)бронхиолярная область включала слизистую до края внешней соединительной ткани бронхиол с максимальным диаметром 600 мкм. Когда край внешней соединительной ткани был неразличим, его устанавливали на расстоянии, в два раза превышающем максимальную толщину слизистой оболочки. Оценка альвеолярной области проводилась на полях без крупных кровеносных сосудов (диаметр > 200 мкм) и бронхиол. Подсчеты проводили на 5 (пери)васкулярных или (пери)бронхиолярных областях и 10 альвеолярных полях и выражали как среднее арифметическое. Полученные результаты для внеклеточных цитНЗ, внеклеточных МРО и НВЛ представлены на Фигуре 3, панели b, c и d соответственно.

Два продольных среза, расположенные на расстоянии 10 мкм друг от друга, были получены из ткани легких, залитой парафином, и окрашены гематоксилином и эозином. Качество срезов оценивали и отбраковывали, если они были разорваны, подняты или плохо окрашивались. Количество эозинофилов, нейтрофилов, макрофагов и фагоцитарных макрофагов подсчитывал в (пери)васкулярной, (пери)бронхиолярной или альвеолярной области патолог, который не имел информации о распределении в группы лечения.

Более подробно: подсчеты проводились отдельно в каждой анатомической области по случайным координатам среза легкого. Клетки в (пери)васкулярной области включались при инфильтрации из просвета сосуда в стенку сосуда и внутрь внешней эластичной пластинки кровеносных сосудов с диаметром < 300 мкм. Клетки в (пери)бронхиолярной области включались при инфильтрации в слизистую оболочку, мышечную оболочку или внешнюю эластичную пластинку бронхиолы с диаметром < 600 мкм. Клетки в альвеолярной области подсчитывали в полях альвеолярной области без присутствия крупных бронхиол и кровеносных сосудов

(диаметр > 100 мкм). Подсчеты проводили на десяти полях в каждой области легкого и выражали результаты как среднее арифметическое.

Эозинофилы определяли как клетки, демонстрирующие типичную ядерную морфологию эозинофилов с прозрачными эозин-положительными цитозольными вакуолями, и количество клеток изображено на панели e. Нейтрофилы определяли по их типичной ядерной морфологии нейтрофилов, из которой были исключены палочкоядерные клетки, и количество клеток представлено на панели f. Клетки с классической морфологией макрофагов подсчитывали как макрофаги, и данные представлены на панели g. Макрофаги с прозрачными и многочисленными цитозольными вакуолями, включая вакуоли, слитые с клеточной мембраной, регистрировали как фагоцитарные макрофаги. Процентную долю фагоцитарных макрофагов рассчитывали путем деления количества фагоцитарных макрофагов на общее количество макрофагов и умножения на 100% и изображали на графиках панели h.

Данные на Фигуре 3 представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM) на группу, за исключением полуколичественной оценки НВЛ на панели d, которая показывает медиану на группу (по 8 животных в каждой группе). Статистический анализ проводили отдельно в каждой группе способа введения по критерию Краскала — Уоллеса с последующим тестом множественного сравнения по Данну с использованием Prism 9. незнач. $p > 0,05$, # или * $p < 0,05$, ## или ** $p < 0,01$, ### или *** $p < 0,001$, #### или **** $p < 0,0001$.

На графике на Фигуре 3, панель a, показано, что как дексаметазон, так и антитело tАСРА приводили к снижению уровня дцДНК в BALF мышей, которым вводили НДМ. Результаты на Фигуре 3, панель b, демонстрируют наличие цитНЗ в качестве маркера для внеклеточных ловушек в трех различных областях легких — (пери)сосудистой, (пери)бронхиолярной и альвеолярной — при введение в организм вещества, провоцирующего выделение антител. Хотя это различие не является значимым во всех трех областях легких, при лечении дексаметазоном или мышинным антителом tАСРА наблюдается явное снижение количества цитНЗ. Аналогичная тенденция наблюдается для внеклеточного МРО (компонент НВЛ) и диффузных внеклеточных НВЛ, показанных на Фигуре 3, панели c и d.

На Фигуре 3, панели e и f, показано, хотя оно в большинстве случаев не является статистически значимым, небольшое снижение количества эозинофилов и нейтрофилов при лечении дексаметазоном или антителом tАСРА, при этом

снижение количества нейтрофилов в (пери)бронхиолярной и альвеолярной области было более выраженным в случае лечения антителом tАСРА по сравнению с лечением дексаметазоном. Графики на Фигуре 3, панели g и h, показывают, что процентная доля фагоцитарных макрофагов увеличивалась только при лечении антителом tАСРА, в то время как общее количество макрофагов оставалось таким же, как у животных, которым вводили вещество, провоцирующее выделение антител, и животных, получавших дексаметазон.

10 **Пример 4. СІТ-013 ингибирует ЭЭТоз, индуцированный иммунными комплексами**

Эозинофилы выделяли из крови здоровых добровольцев. Сначала из крови выделяли гранулоциты с помощью градиентного центрифугирования с фиколлом и последующего лизиса эритроцитов с помощью буфера АСК. Затем из фракции гранулоцитов выделяли эозинофилы путем отрицательного отбора с магнитными гранулами, используя набор для выделения эозинофилов от Miltenyi Biotec (номер по каталогу 130-092-010) в соответствии с протоколом производителя. Чистоту фракции эозинофилов проверяли на основании экспрессии сиглек-8 и CD16, определенной с помощью проточной цитометрии. Были включены данные о фракциях эозинофилов, содержащих > 85% эозинофилов (сиглек-8+ CD16-) из отдельных жизнеспособных лейкоцитов CD45+ и содержащих менее 10% нейтрофилов (сиглек-8- и CD16+).

Иммобилизованные иммунные комплексы (сІС) получали путем покрытия 96-луночных планшетов Nunc MaxiSorp (Invitrogen) с использованием 10 мкг/мл сывороточного альбумина человека (HSA; Seqens IVD) при 4 °С в течение ночи. Для удаления несвязанного HSA использовали промывочный буфер (PBS, содержащий 0,05% Tween 20). После трех промывок планшеты инкубировали с 50 мкл кроличьего антитела к альбумину (Sigma-Aldrich) при концентрации 10 мкг/мл на лунку в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании. Лунки промывали три раза промывочным буфером и три раза DPBS. Затем эозинофилы высевали в концентрации 20 000 клеток на лунку в среду RPMI 1640 с L-глутамином и без фенолового красного (Gibco), содержащую 1% пенициллина и стрептомицина, 0,1% BSA и 10 мМ HEPES. Лунки, покрытые только HSA, использовали в качестве контроля стимулов. В лунки добавляли Sytox Green (Invitrogen), не проникающий сквозь клеточную мембрану краситель ДНК, до конечной концентрации 20 мМ.

Клетки стимулировали в присутствии или в отсутствие 25 мкг/мл СИТ-013 или изотипического контрольного антитела (изотип; антитело к лизоциму куриных яиц, CrownBio, кат. № C0001). Изображения получали каждые 60 минут с использованием системы визуализации живых клеток IncuCyte SX1 (Satorius).

5 Образование внеклеточных ловушек анализировали на основании сигнала Sytox Green с использованием программного обеспечения для анализа IncuCyte SX1. Сигналы Sytox Green с площадью больше, чем площадь клеток, и с низкой средней интенсивностью из-за деконденсации ДНК считали внеклеточными ловушками. Чтобы оценить процентную долю клеток, высвобождающих ЭВЛ, количество клеток

10 определяли на фазово-контрастных изображениях, полученных в ранний момент времени, с использованием программного обеспечения для анализа IncuCyte SX1. Репрезентативное изображение сигнала Sytox Green через 4 часа показано на Фигуре 4, панель а, с масштабной меткой 50 мкм (n = 8 доноров). Для каждого донора количество ЭВЛ в течение 4 часов в присутствии СИТ-013 или

15 изотипического контрольного антитела показано на Фигуре 4, панель b, вместе с разницей в количестве ЭВЛ между двумя условиями (Δ) (n = 8 доноров). Статистический анализ проводили с помощью критерия Фридмана для парных образцов с использованием Prism, $***p < 0,001$. На обеих панелях на Фигуре 4 демонстрируется ингибирование высвобождения ЭВЛ с помощью СИТ-013 в

20 сравнении с изотипическим контрольным антителом.

Список последовательностей

25 SEQ ID NO: 1 — CDR1, относящийся к msVH22.101 и hVH22.101(HC)x
GYTFTNYG

SEQ ID NO: 2 — CDR2, относящийся к msVH22.101 и hVH22.101(HC)x
INTYSGEA

30 SEQ ID NO: 3 — CDR3, относящийся к msVH22.101 и hVH22.101(HC)x
LRGYTYQSFDEGGDY

SEQ ID NO: 4 — CDR2, относящийся к msVL22.101 и hVL22.101(LC)y
LVS

35 SEQ ID NO: 5 — CDR3, относящийся к msVL22.101 и hVL22.101(LC)y
WQGTHTFPYT

40 SEQ ID NO: 6 — CDR1, относящийся к hVL22.101LC17
QSLLDTDGKTY

- SEQ ID NO: 7 — CDR1, относящийся к hVL22.101LC21
QSLLDSDAKTY
- 5 SEQ ID NO: 8 — CDR1, относящийся к hVL22.101LC27
QSLLDTDAKTY
- SEQ ID NO: 9 — CDR1, относящийся к hVL22.101LC41
QSLLDADGKTY
- 10 SEQ ID NO: 10 — CDR1, относящийся к hVL22.101LC42
QSLLDNDGKTY
- SEQ ID NO: 11 — hVH22.101f
- 15 RIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMHWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGEATYA
QKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCLRGYTYQSFDEGGDYWGQGLVTVSS
- SEQ ID NO: 12 — hVH22.101HC9
- RIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMHWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGEATYV
- 20 DDFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCLRGYTYQSFDEGGDYWGQGLVTVSS
- SEQ ID NO: 13 — hVL22.101LC17
- DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLLDTDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
- GVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK
- 25 SEQ ID NO: 14 — hVL22.101LC21
- DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDAKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
- GVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK
- 30 SEQ ID NO: 15 — hVL22.101LC27
- DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLLDTDAKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
- GVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK
- SEQ ID NO: 16 — hVL22.101LC41
- 35 DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLLDADGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
- GVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK
- SEQ ID NO: 17 — hVL22.101LC42
- DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLLDNDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
- 40 GVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK
- SEQ ID NO: 18 — последовательность SEQ ID NO 1 из WO2016092082
(используется в примере 1/7) из гистона 2A
SGXGKQGGKARA
- 45 где X это цитруллин
- SEQ ID NO: 19 — последовательность SEQ ID NO 2 из WO2016092082
(используется в примере 7) из гистона 4
SGXGKGGKGLGKGGAKRHRKVLK
- 50 где X это цитруллин

- SEQ ID NO: 20 — укороченная последовательность SEQ ID NO 2 из WO2016092082 (используется в примере 7) из гистона 4
SGXGKGGKGLGK
где X это цитруллин
- 5
- SEQ ID NO: 21 — пептид 4 (гистон 2A человека) (SEQ ID NO 24 из WO2011070172)
QFPVGXVHRLLR
где X это цитруллин
- 10
- SEQ ID NO: 22 — пептид 6 (гистон 2A человека) (SEQ ID NO 26 из WO2011070172)
VHRL LXKGN YSE
где X это цитруллин
- 15
- SEQ ID NO: 23 — константный домен тяжелой цепи человеческого IgG1
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFFPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
20 FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
- 25
- SEQ ID NO: 24 — константный домен каппа-цепи человеческого антитела
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
- 30
- SEQ ID NO: 25 — msVH22.101
RIQLVQSGPELKKPGAEAVKISCKASGYTFTNYGMHWMKQTPGKDFRWMGWINTYSGEATYV
DDFKGRFAFSLGTSASTAYLQINN LKNDTATYFCLRGYTYQSFDEGGDYWGQGTALT VSS
- 35
- SEQ ID NO: 26 — hVH22.101j
QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYGMHWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGEATYA
QKFQGRVTMTRDTSISTAYMEL SRLRSDDTAVYYCLRGYTYQSFDEGGDYWGQGT LVT VSS
- 40
- SEQ ID NO: 27 — hVH22.101HC7
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTNYGMHWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGEATYA
QKFQGRVTITADESTSTAYMEL SSSLRSED TAVYYCLRGYTYQSFDEGGDYWGQGT LVT VSS
- 45
- SEQ ID NO: 28 — hVH22.101HC8
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTNYGMHWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGEATYV
DDFQGRVTITADESTSTAYMEL SSSLRSED TAVYYCLRGYTYQSFDEGGDYWGQGT LVT VSS
- 50
- SEQ ID NO: 29 — hVH22.101HC10
QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYGMHWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGEATYV
DDFQGRVTMTRDTSISTAYMEL SRLRSDDTAVYYCLRGYTYQSFDEGGDYWGQGT LVT VSS
- 55
- SEQ ID NO: 30 — msVL22.101
DVMVTQTPLT LSVTTGQPASISCKSSQSL L DSDGKTYLNWLFQRP GQSPKRLIYLVSKLDS
GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCWQGT HFPYTFGGGTNLEIK
- 60
- SEQ ID NO: 31 — hVL22.101e

DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 32 — hVL22.101g

5 DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLLDSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 33 — hVL22.101h

10 DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVASDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 34 — hVL22.101i

15 DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVESDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 35 — hVL22.101j

DVVMTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVSSDGKTYLNWFQQRPGQSPRRLIYLVSKLDS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGQGTKLEIK

20 SEQ ID NO: 36 — CDR1, относящийся к msVL22.101 и hVL22.101g
QSLLDSDGKTY

SEQ ID NO: 37 — CDR1, относящийся к hVL22.101e
QSLVSDGKTY

25

SEQ ID NO: 38 — CDR1, относящийся к hVL22.101h
QSLVASDGKTY

30 SEQ ID NO: 39 — CDR1, относящийся к hVL22.101i
QSLVESDGKTY

SEQ ID NO: 40 — CDR1, относящийся к hVL22.101j
QSLVSSDGKTY

35 SEQ ID NO: 41 — CDR1, относящийся к hVL22.101LC16
QSLLESDGKTY

SEQ ID NO: 42 — CDR1, относящийся к hVL22.101LC19
QSLLDSEGKTY

40

SEQ ID NO: 43 — CDR1, относящийся к hVL22.101LC20
QSLLDSSGKTY

45 SEQ ID NO: 44 — CDR1, относящийся к hVL22.101LC22
QSLLESEGKTY

SEQ ID NO: 45 — CDR1, относящийся к hVL22.101LC23
QSLLESSGKTY

50 SEQ ID NO: 46 — CDR1, относящийся к hVL22.101LC24
QSLLESDAKTY

- SEQ ID NO: 47 — CDR1, относящийся к hVL22.101LC25
QSLLDTEGKTY
- 5 SEQ ID NO: 48 — CDR1, относящийся к hVL22.101LC26
QSLLDTSKGKTY
- SEQ ID NO: 49 — CDR1, относящийся к hVL22.101LC37
QSLLDTSAGKTY
- 10 SEQ ID NO: 50 — CDR1, относящийся к hVL22.101LC38
QSLLESAGKTY
- SEQ ID NO: 51 — CDR1, относящийся к hVL22.101LC39
15 QSLLDAEGKTY
- SEQ ID NO: 52 — CDR1, относящийся к hVL22.101LC40
QSLLDNEGKTY
- 20 SEQ ID NO: 53 — msFibB XG (SEQ ID NO 37 из WO2011070172)
EPTDSLDAHGHRPVDRR
где X это цитруллин
- SEQ ID NO: 54 — msVim XS/XL (SEQ ID NO 38 из WO2011070172)
25 YVTXSSAVXLXSSVP
где X это цитруллин
- SEQ ID NO: 55 — участок вокруг CDR2, относящегося к msVL22.101 и
hVL22.101(LC)y
30 LVSKLDS
- SEQ ID NO: 56 — константный домен тяжелой цепи, относящийся к hCH22.101f
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPS
35 VFLEPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSAFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ ингибирования образования эозинофильных внеклеточных ловушек (ЭВЛ), включающий введение антитела или его связывающего фрагмента, которые
5 специфично связываются с цитруллинированным эпитопом на дезиминированном гистоне 2А и/или гистоне 4 человека, в образец или субъекту, в котором или у которого присутствуют эозинофилы.
2. Способ по п. 1, который предназначен для предотвращения или лечения
заболевания или состояния у субъекта, причем указанный способ включает введение
10 указанного антитела или его связывающего фрагмента указанному субъекту в профилактически или терапевтически эффективном количестве.
3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что указанное заболевание или состояние
включает патологию, связанную с ЭВЛ.
4. Способ по п. 2 или 3, отличающийся тем, что указанное заболевание или
15 состояние представляет собой эозинофильное заболевание или состояние.
5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что указанное эозинофильное заболевание
или состояние представляет собой эозинофильное заболевание или состояние кожи;
респираторное эозинофильное заболевание или состояние; желудочно-кишечное
эозинофильное заболевание или состояние; аллергическое заболевание или
20 состояние; или гельминтную, грибковую, вирусную или бактериальную инфекцию.
6. Способ по любому из пп. 2–5, отличающийся тем, что указанное заболевание
или состояние выбрано из: буллезного пемфигоида, атопического дерматита,
аллергического контактного дерматита, эозинофильной астмы, хронического
риносинусита с назальным полипозом (CRSwNP), аллергического синусита,
25 аллергического бронхолегочного аспергиллеза, эозинофильного хронического
риносинусита, эозинофильного эзофагита (ЕоЕ), гиперэозинофильного синдрома
(HES), эозинофильного гранулематоза с полиангиитом (EGPA), эозинофильного
среднего отита (EOM) и лекарственной реакции с эозинофильными и системными
симптомами (DRESS), артериосклероза и васкулита.
- 30 7. Способ по любому из пп. 2–6, отличающийся тем, что указанное заболевание
или состояние выбрано из: эозинофильной астмы, хронического риносинусита с

назальным полипозом (CRSwNP), эозинофильного хронического риносинусита, эозинофильного среднего отита (ЕОМ), артериосклероза и васкулита.

8. Способ по п. 1, который предназначен для *ex vivo* ингибирования или обнаружения образования ЭВЛ в образце и который включает введение указанного антитела или его связывающего фрагмента в указанный образец и инкубирование в условиях, подходящих для осуществления связывания, необязательно при этом указанный образец представляет собой биологическую жидкость, полученную от субъекта, такую как сыворотка или кровь, и необязательно при этом указанный образец обрабатывают, например, для выделения эозинофилов.
9. Способ по любому из пп. 1–8, отличающийся тем, что указанные антитело или его связывающий фрагмент содержат:
- а) CDR1 VL, где CDR содержит или состоит из аминокислотной последовательности QSL-X₁-D-X₂-D-X₃-КТУ, где X₁ представляет собой V или L, X₂ представляет собой T, S, A или N, и X₃ представляет собой G или A, предпочтительно при этом аминокислотная последовательность не является последовательностью QSLLDSDGКТУ (SEQ ID NO: 36) или QSLVDSDGКТУ (SEQ ID NO: 37); и
- б) по меньшей мере один CDR, выбранный из SEQ ID NO: 1–5, необязательно по меньшей мере CDR SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5, и предпочтительно все пять CDR SEQ ID NO: 1–5.
10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанные антитело или его связывающий фрагмент содержат:
- а) CDR1 VL SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9 или 10; и
- б) CDR SEQ ID NO: 1–5;
- ИЛИ
- а) CDR VL из любой из SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16 или 17; и
- б) аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи с SEQ ID NO: 11 или 12.
11. Способ по п. 9 или 10, отличающийся тем, что указанные антитело или его связывающий фрагмент содержат:
- (I) переменную область легкой цепи, содержащую:

- 5 а) CDR1 VL, причем CDR содержит или состоит из аминокислотной последовательности QSL-X₁-D-X₂-D-X₃-KTY, где X₁ представляет собой V или L, X₂ представляет собой T, S, A или N, и X₃ представляет собой G или A, предпочтительно при этом аминокислотная последовательность не является последовательностью QSLLDSDGKTY (SEQ ID NO: 36) или QSLVDSGKTY (SEQ ID NO: 37), и необязательно при этом указанный CDR1 выбран из SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9 или 10; и
- 10 б) по меньшей мере один и предпочтительно оба из CDR2 VL SEQ ID NO: 4 и CDR3 VL SEQ ID NO: 5;
- и
- (II) переменную область тяжелой цепи, содержащую:
- 15 в) аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 или 12; или
- д) фрагмент по меньшей мере из 7 аминокислот последовательности по п. (в); при этом указанные антитело или его связывающий фрагмент сохраняют специфичную реактивность по отношению к цитруллинированному эпитопу на дезиминированном гистоне 2A и/или гистоне 4 человека; или
- 20 е) вариант последовательности по п. (в), имеющий по меньшей мере 70% идентичность аминокислотной последовательности с последовательностью п. (в), причем указанные антитело или его связывающий фрагмент сохраняют специфичную реактивность по отношению к цитруллинированному эпитопу на дезиминированном гистоне 2A и/или гистоне 4 человека.
12. Способ по любому из пп. 9–11, отличающийся тем, что указанные антитело или его связывающий фрагмент содержат:
- 25 а) аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 11 и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 13;
- б) аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 11 и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 14;
- 30 в) аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 11 и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 15;

- d) аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 11 и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 16;
- 5 e) аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 11 и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 17;
- f) аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 12 и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 13;
- 10 g) аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 12 и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 14;
- h) аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 12 и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 15;
- i) аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 12 и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 16; или
- 20 j) аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 12 и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 17.

13. Способ по любому из пп. 1–12, отличающийся тем, что указанные антитело или его связывающий фрагмент специфично связываются с пептидом, выбранным из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21 и 22, и связываются с дезиминированным гистоном 2A и/или гистоном 4 человека, предпочтительно с аффинностью по меньшей мере 1 нМ или менее.

14. Способ по любому из пп. 1–13, отличающийся тем, что (i) указанные антитело или его связывающий фрагмент выбраны из группы, состоящей из рекомбинантных антител, одноцепочечных антител, одноцепочечных переменных фрагментов (scFv), переменных фрагментов (Fv), фрагментов антигенсвязывающих областей (Fab), однодоменных антител (sdAb), VHH-антител, нанотел, однодоменных антител, происходящих от верблюдовых, фрагментов однодоменных

антител, происходящих от IgNAR-антител акулы (VNAR), диател, триател, антикалинов и аптамеров, и предпочтительно представляют собой полноразмерное антитело, и/или (ii) причем указанные антитело или его связывающий фрагмент конъюгированы с дополнительным фрагментом.

5

15. Способ по любому из пп. 1–14, отличающийся тем, что указанные антитело или его связывающий фрагмент содержат Fc-область, такую как область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, необязательно при этом константная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 23 или 56, и/или константная область легкой цепи содержит SEQ ID NO: 24.

10

16. Способ по любому из пп. 1–15, отличающийся тем, что указанное антитело содержит аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 11, аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 16, аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 или 56 и аминокислотную последовательность константной области легкой цепи SEQ ID NO: 24.

15

17. Способ по любому из пп. 1–16, отличающийся тем, что указанный способ ингибирует образование эозинофильных внеклеточных ловушек (ЭВЛ) и нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) одновременно.

20

18. Способ лечения или предотвращения нарушения легкого, включающий введение антитела или его связывающего фрагмента, которые специфично связываются с цитруллинированным эпитопом на дезиминированном гистоне 2A и/или гистоне 4 человека, субъекту с указанным нарушением легкого.

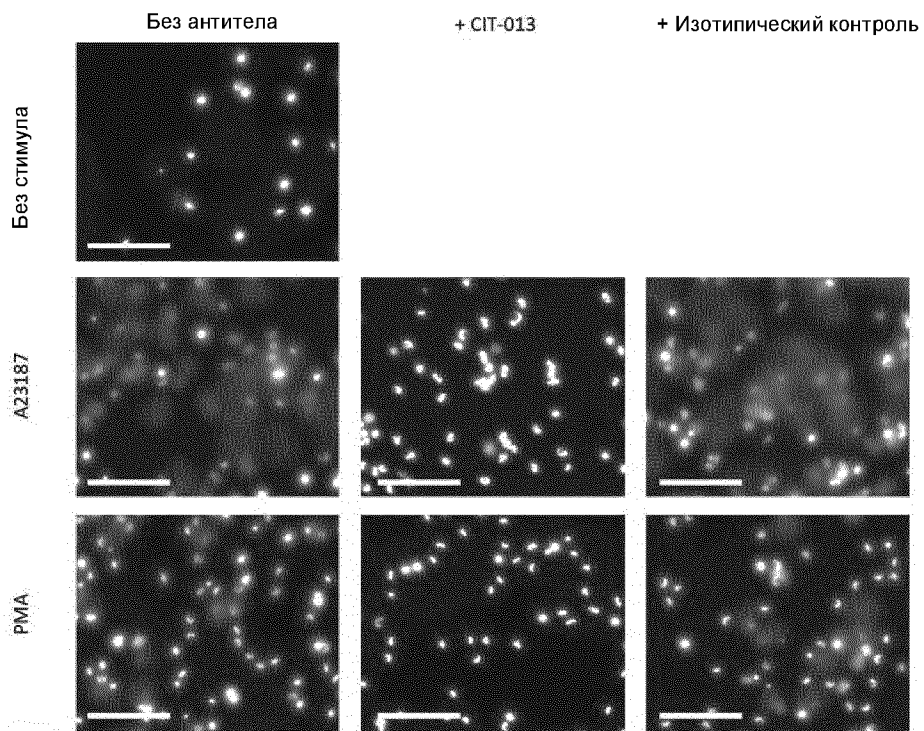
25

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что:

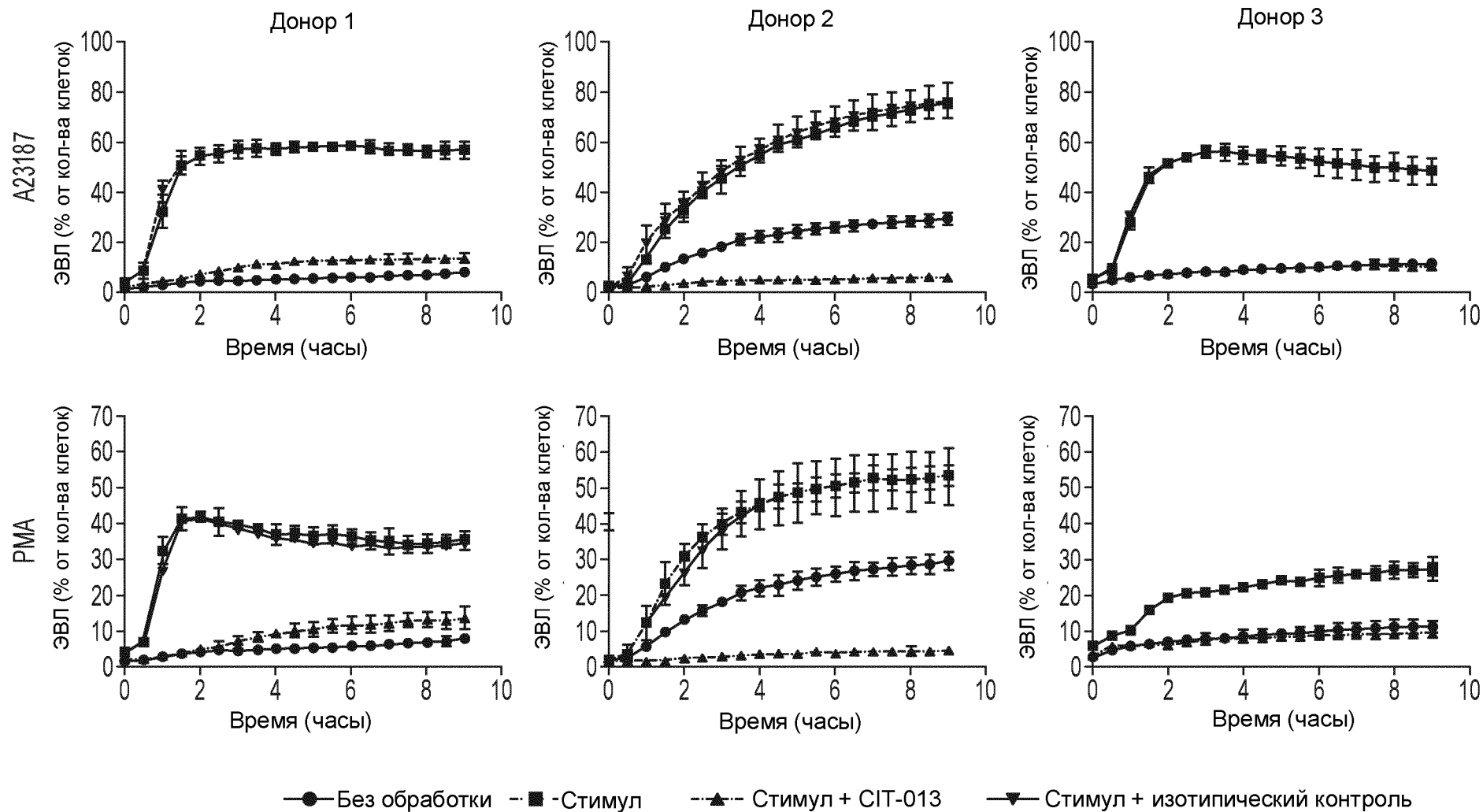
- (a) состояние представляет собой воспалительное нарушение легкого;
- (b) нарушение легкого характеризуется повышением уровня нейтрофилов и/или эозинофилов в легких указанного субъекта;
- (c) указанный способ дополнительно включает введение кортикостероида; и/или
- (d) у указанного субъекта имеется нарушение легкого, которое не реагирует на кортикостероиды.

30

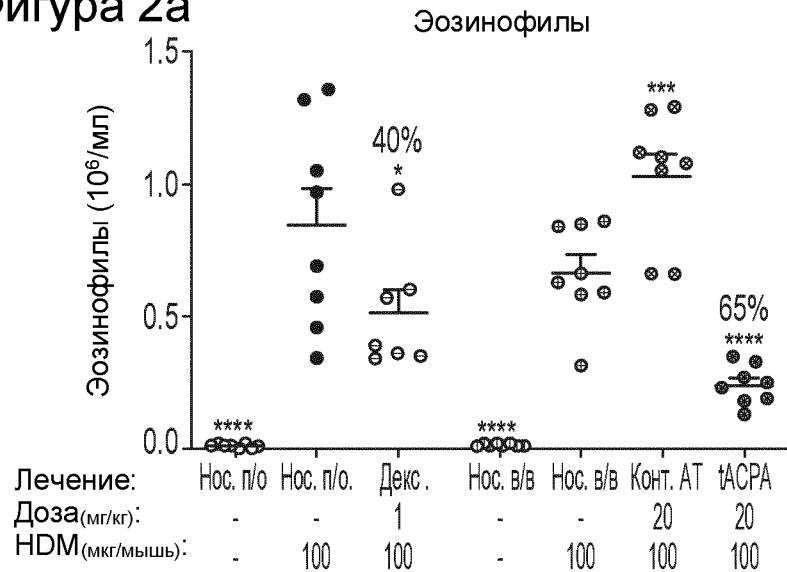
Фигура 1а



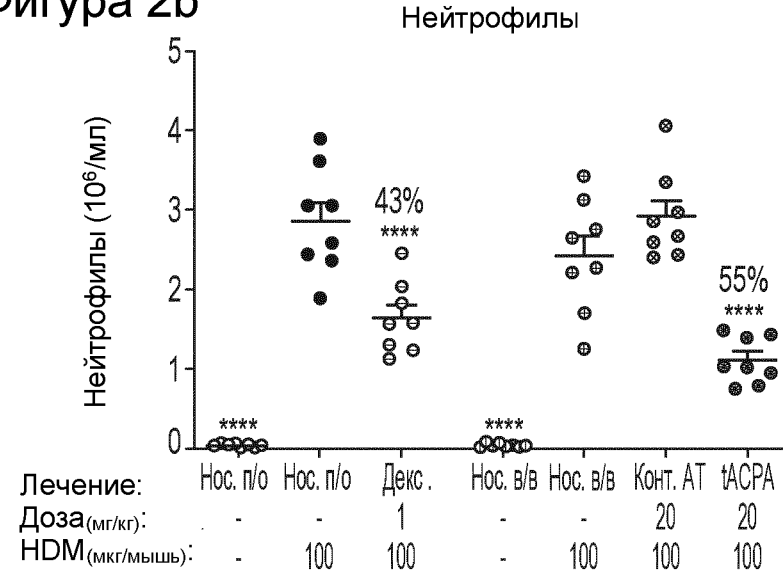
Фигура 1b



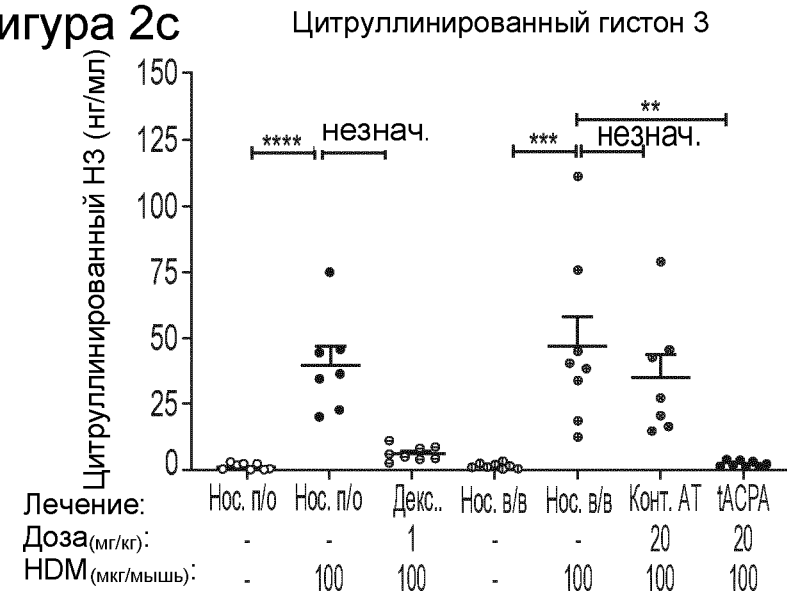
Фигура 2а



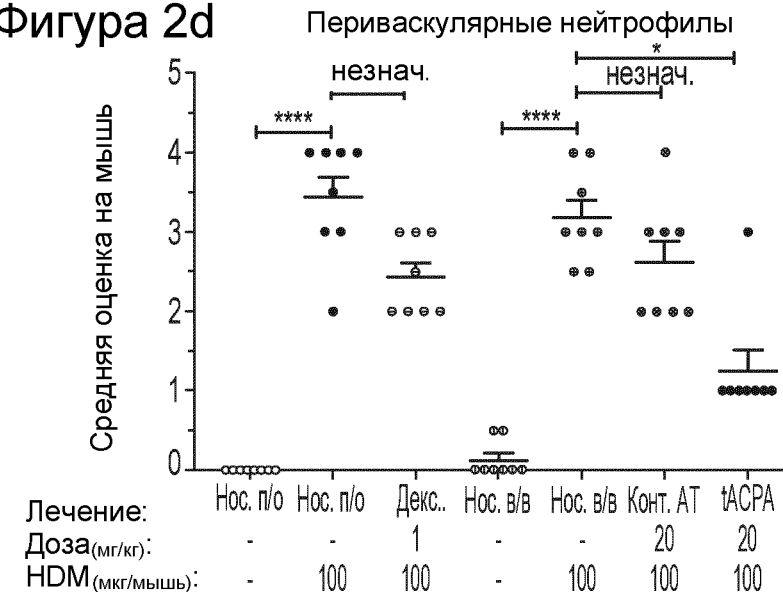
Фигура 2b



Фигура 2с

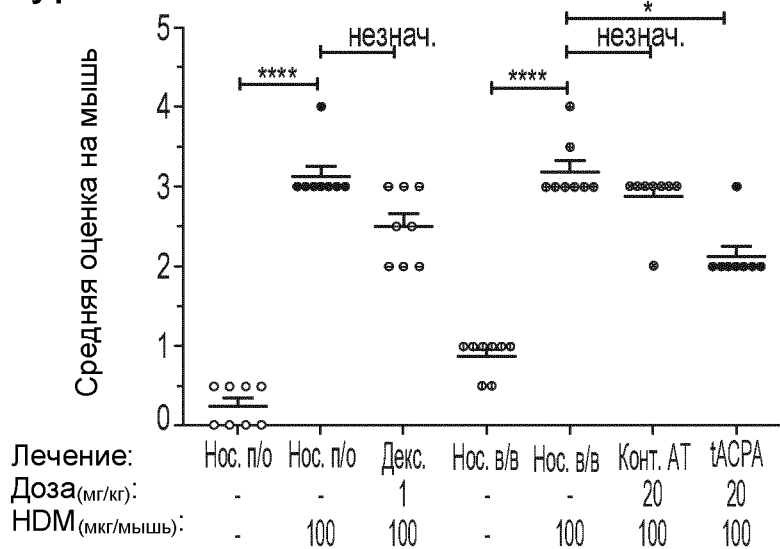


Фигура 2d



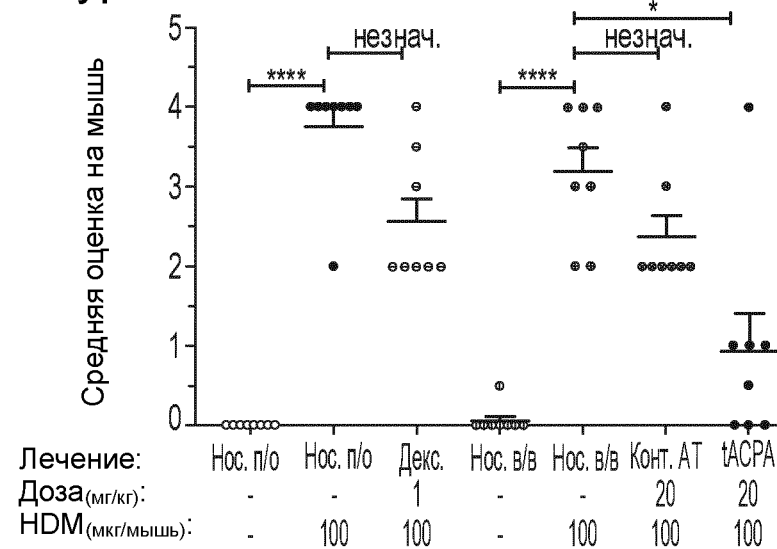
Фигура 2e

Периваскулярные мононуклеарные клетки

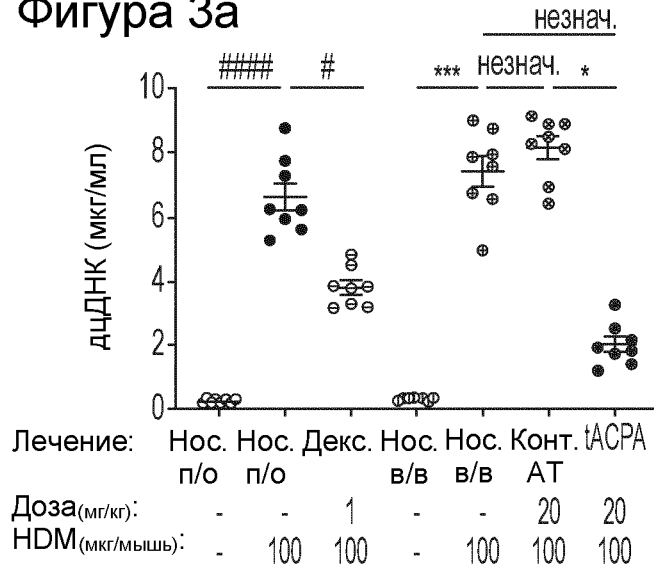


Фигура 2f

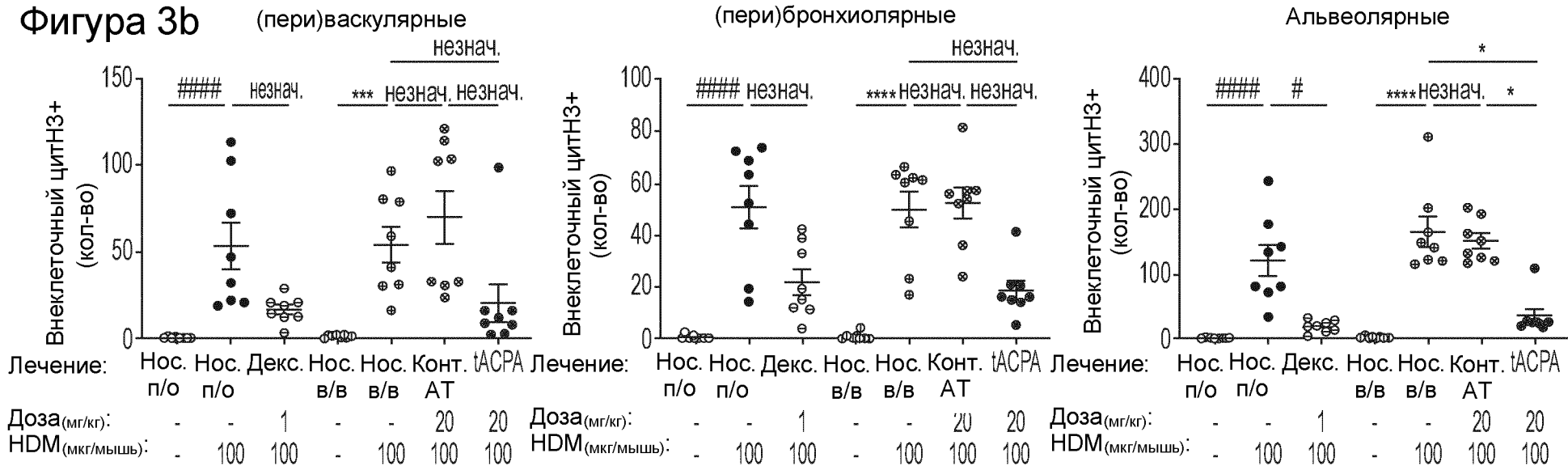
Бронхиолярные нейтрофилы



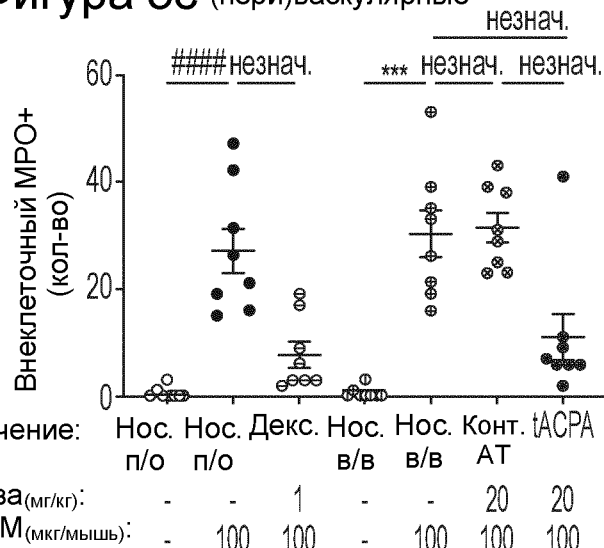
Фигура 3а



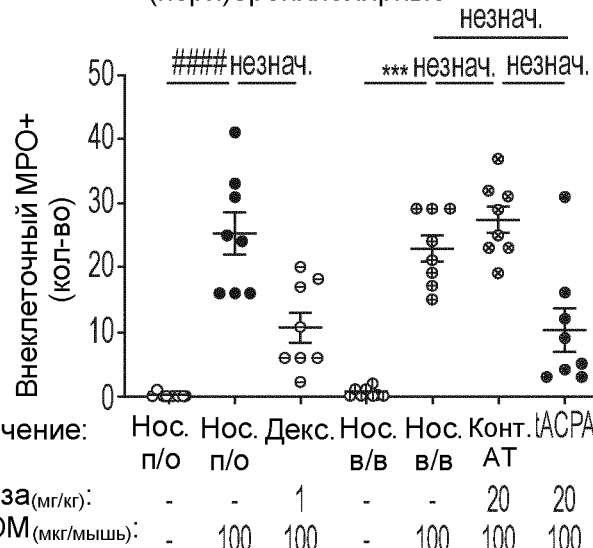
Фигура 3б



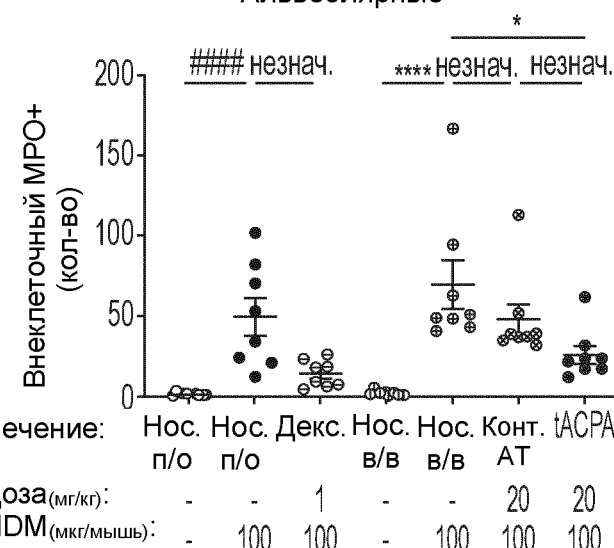
Фигура 3с (пери)васкулярные



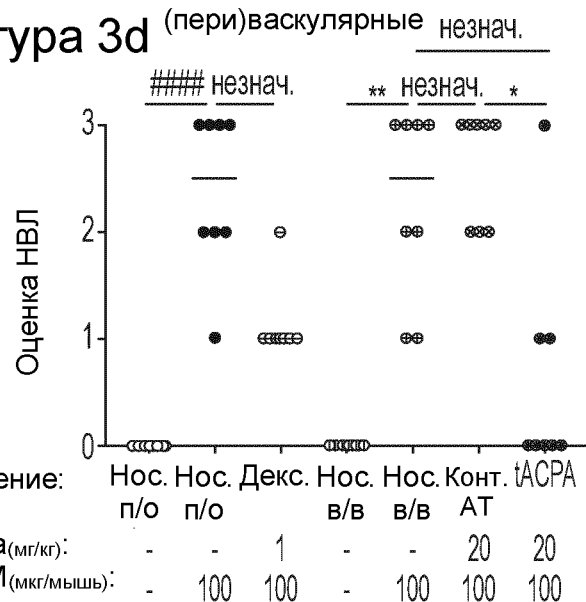
(пери)бронхиолярные



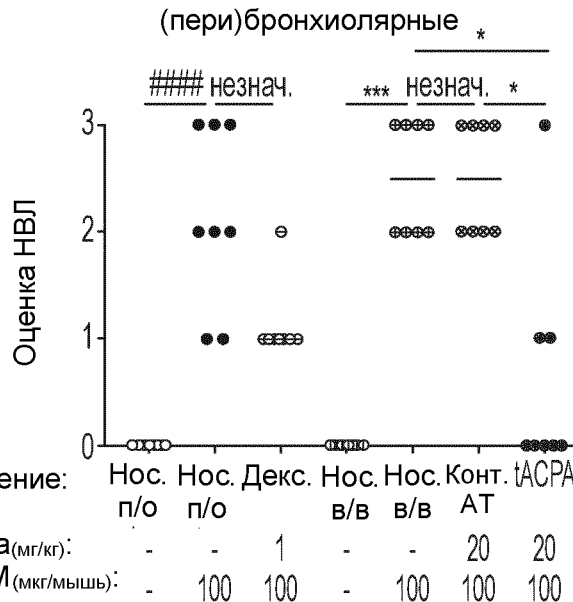
Альвеолярные



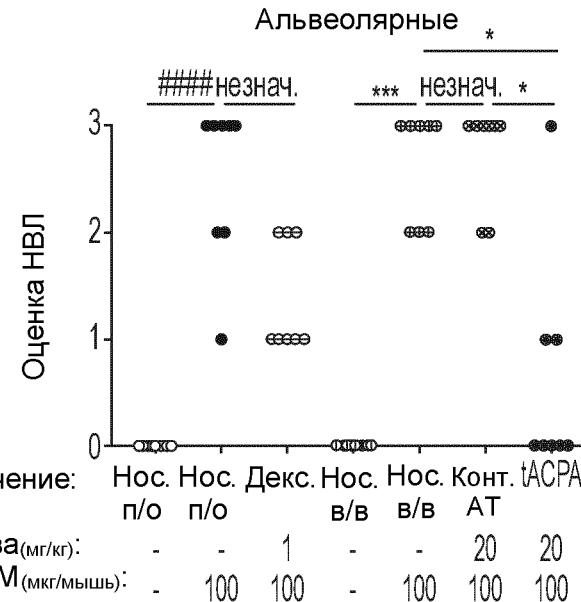
Фигура 3д (пери)васкулярные



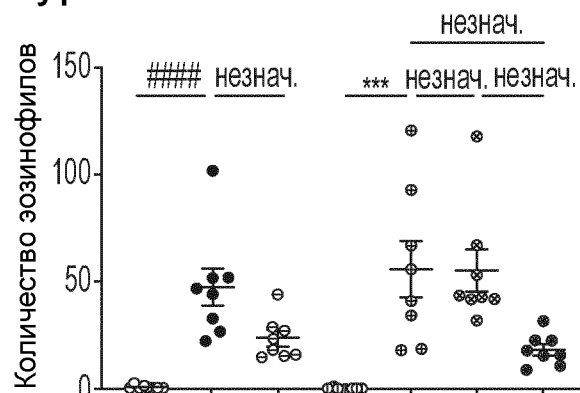
(пери)бронхиолярные



Альвеолярные

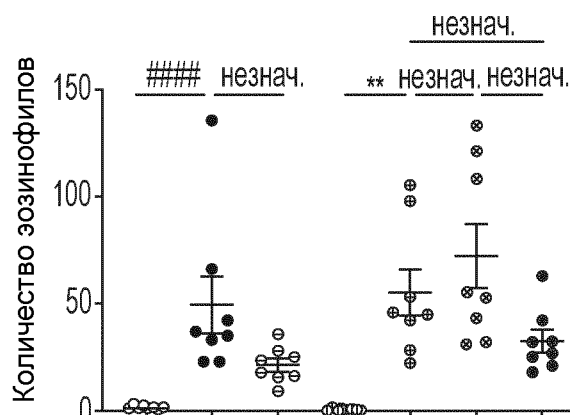


Фигура 3е (пери)васкулярные



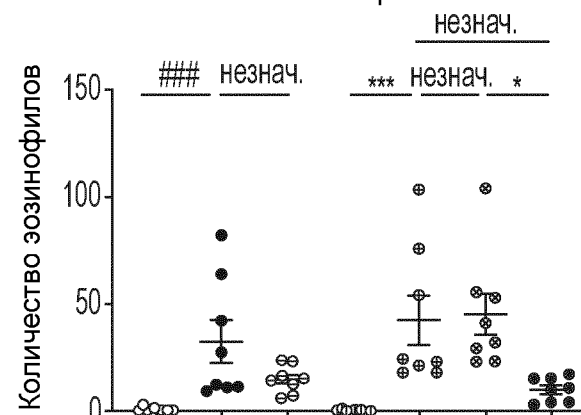
Лечение: Nos. p/o, Nos. Дек. п/о, Дек. в/в, Nos. в/в, Kont. tACPA AT
 Доза (мг/кг): -, -, 1, -, -, 20, 20
 HDM (мкг/мышь): -, 100, 100, -, 100, 100, 100

(пери)бронхиоллярные



Лечение: Nos. p/o, Nos. Дек. п/о, Дек. в/в, Nos. в/в, Kont. tACPA AT
 Доза (мг/кг): -, -, 1, -, -, 20, 20
 HDM (мкг/мышь): -, 100, 100, -, 100, 100, 100

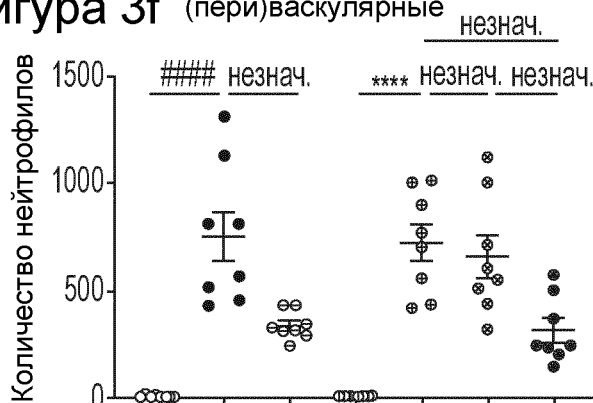
Альвеолярные



Лечение: Nos. p/o, Nos. Дек. п/о, Дек. в/в, Nos. в/в, Kont. tACPA AT
 Доза (мг/кг): -, -, 1, -, -, 20, 20
 HDM (мкг/мышь): -, 100, 100, -, 100, 100, 100

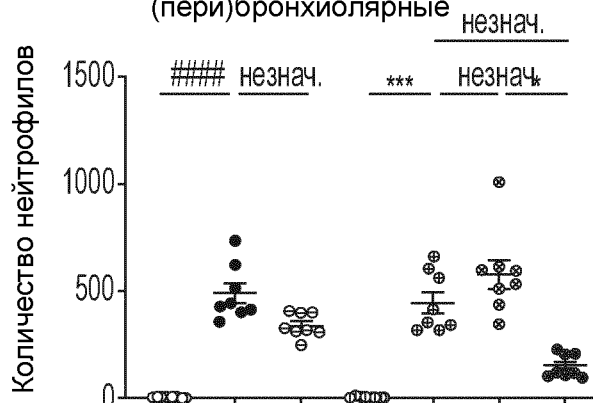
7/9

Фигура 3ф (пери)васкулярные



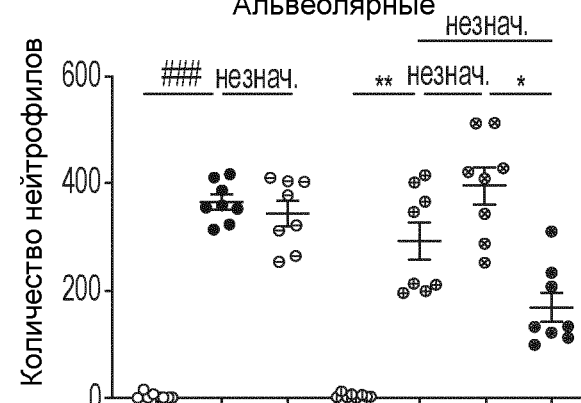
Лечение: Nos. p/o, Nos. Дек. п/о, Дек. в/в, Nos. в/в, Kont. tACPA AT
 Доза (мг/кг): -, -, 1, -, -, 20, 20
 HDM (мкг/мышь): -, 100, 100, -, 100, 100, 100

(пери)бронхиоллярные



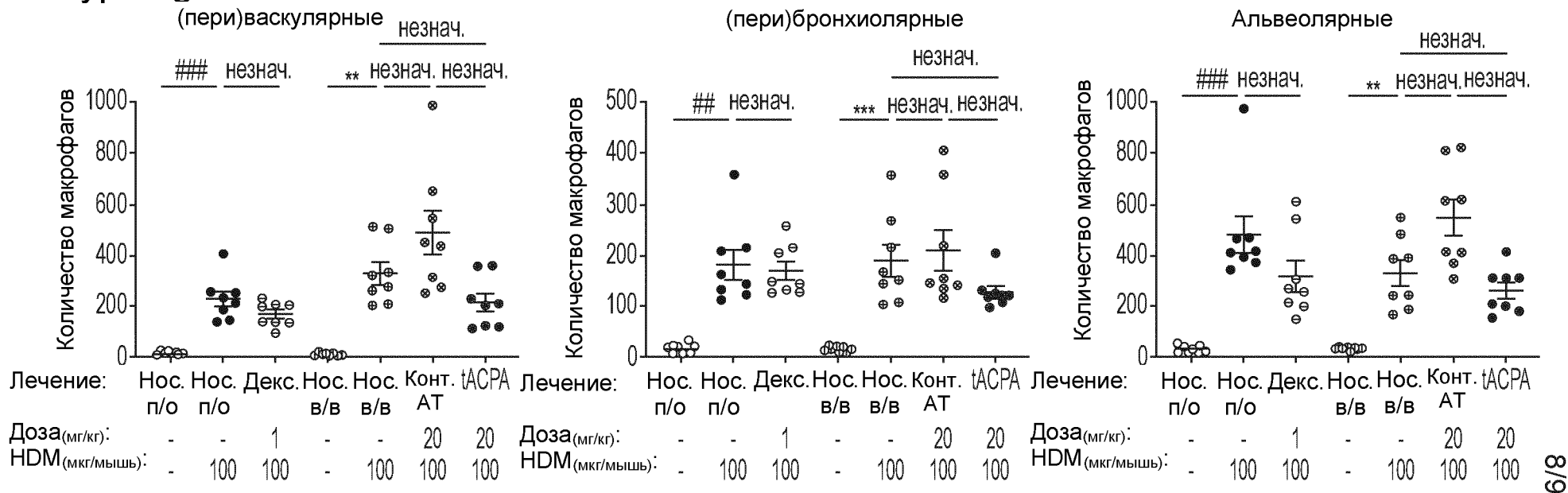
Лечение: Nos. p/o, Nos. Дек. п/о, Дек. в/в, Nos. в/в, Kont. tACPA AT
 Доза (мг/кг): -, -, 1, -, -, 20, 20
 HDM (мкг/мышь): -, 100, 100, -, 100, 100, 100

Альвеолярные

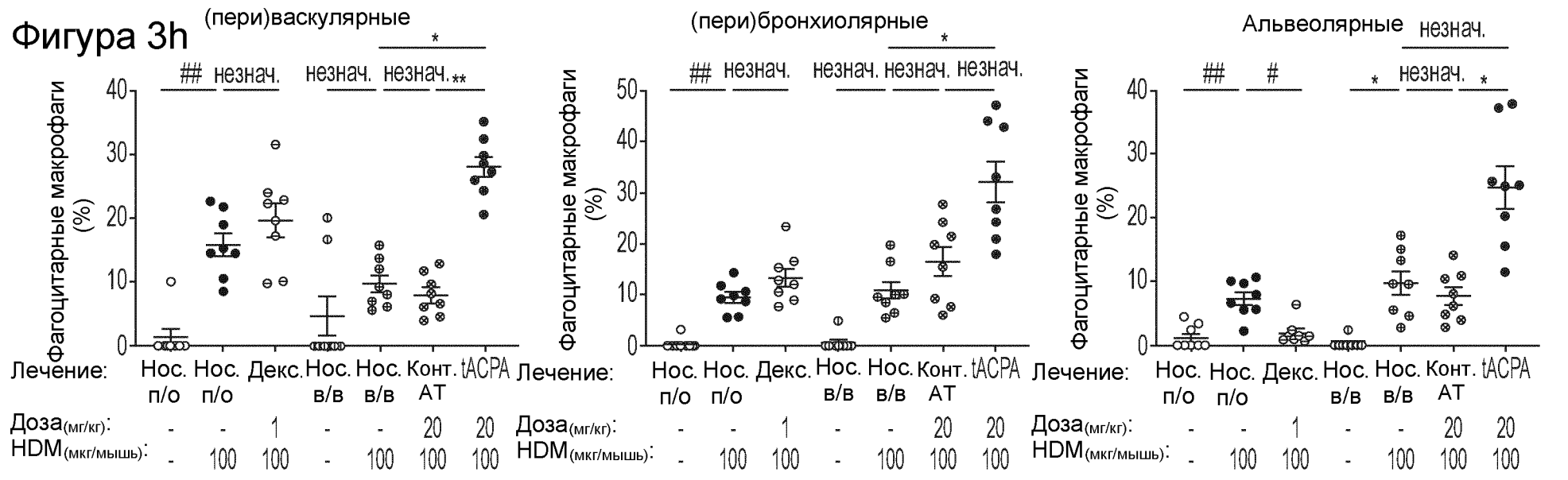


Лечение: Nos. p/o, Nos. Дек. п/о, Дек. в/в, Nos. в/в, Kont. tACPA AT
 Доза (мг/кг): -, -, 1, -, -, 20, 20
 HDM (мкг/мышь): -, 100, 100, -, 100, 100, 100

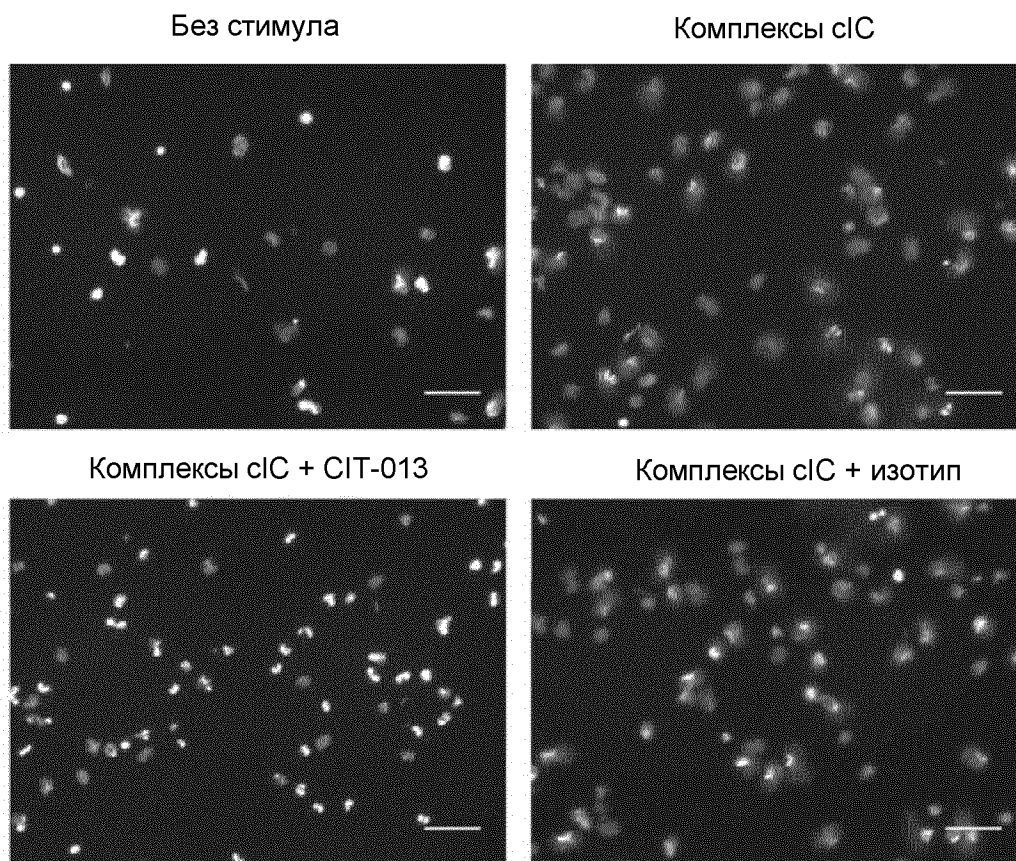
Фигура 3г



Фигура 3н



Фигура 4а



Фигура 4b

