

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202491649** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2024.09.12**

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

(22) Дата подачи заявки  
**2023.01.18**

(54) **АНТИТЕЛА К ГАЛЕКТИНУ-10**

(31) **2200597.9**

(72) Изобретатель:

(32) **2022.01.18**

**Ван Дер Вонинг Поль Себастьян,  
Персье Жан-Мишель (BE)**

(33) **GB**

(86) **PCT/EP2023/051100**

(87) **WO 2023/139107 2023.07.27**

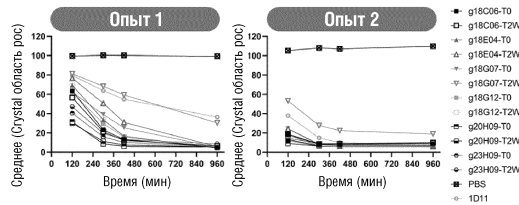
(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(71) Заявитель:

**АРДЖЕНКС БВ (BE)**

(57) Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с белком галектином-10, в частности с галектином-10 человека. Антитела к галектину-10 и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению нарушают кристаллизацию галектина-10 и поэтому могут быть использованы в способах профилактики и лечения заболеваний и состояний, при которых патология связана с образованием/присутствием кристаллов Шарко-Лейдена (CLC).



202491649

A1

A1

202491649

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581115EA/042

### АНТИТЕЛА К ГАЛЕКТИНУ-10

#### ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с белком галектином-10, в частности, с галектином-10 человека. Антитела к галектину-10 и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению нарушают кристаллизацию галектина-10 и поэтому могут быть использованы в способах профилактики и лечения заболеваний и состояний, при которых патология связана с образованием/присутствием кристаллов Шарко-Лейдена (CLC).

#### ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

Галектин-10 (также известный как лейденский кристаллический белок Шарко) представляет собой небольшой (16,5 кДа) автокристаллизующийся гидрофобный гликансвязывающий белок, в большом количестве экспрессируемый в костном мозге, в первую очередь эозинофилами (Chua et al. (2012) *PLoS One*. 7(8): e42549). Галектин-10 также в меньшей степени продуцируется базофилами и Foxp3-положительными Treg (Kubach et al. (2007) *Blood* 110(5): 1550-8). Этот белок является одним из наиболее распространенных компонентов эозинофилов, составляя 7-10% общего клеточного белка. Галектин-10 обнаружен только у людей и приматов, кроме человека, у него отсутствует сигнал секретрируемого пептида и трансмембранный домен, и он секретрируется при определенных условиях с помощью неклассических и новых апокринных механизмов.

Несмотря на многочисленные сообщения о появлении CLC в тканях пациентов с эозинофильными расстройствами, общепринятым было мнение, что эти кристаллы были всего лишь маркером гибели эозинофилов. Эта точка зрения была в конечном итоге опровергнута исследованиями, продемонстрировавшими, что CLC повышают иммунитет 2-го типа на мышинной модели астмы, индуцированной клещами домашней пыли (HDM) (Persson et al., *Science* (2019)). Кроме того, было обнаружено, что CLC присутствуют в большом количестве в липкой слизи пациентов с аспергиллезом и CRSwNP, что позволяет предположить, что CLC способствуют вязкоэластичности слизи (Su J., *Molecules* (2018)).

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Недавние открытия, связанные с образованием галектина-10 и CLC при заболеваниях, указывают на то, что они являются мишенью для терапии. В настоящем документе сообщается, что кристаллы галектина-10 можно растворить путем введения антител к галектину-10. Важно отметить, что описанные в настоящем документе антитела к галектину-10 сохраняют активность и остаются стабильными даже после хранения в течение 4 недель при повышенных температурах, таких как 37°C. В совокупности это демонстрирует, что антитела к галектину-10, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения состояний и расстройств, при которых патология связана с наличием CLC.

В первом аспекте в изобретении предложено антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит последовательности CDR HCDR3, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 2; HCDR2, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 3; HCDR1, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 1; и

(ii) домен VL содержит последовательности CDR LCDR3, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 8; LCDR2, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 9; LCDR1, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; и домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, включающей: одноцепочечное антитело (scFv); фрагмент F(ab')<sub>2</sub>; Fab-фрагмент; Fd фрагмент; Fv фрагмент; однорукое (одновалентное) антитело; диатела, триатела, тетратела или любую антигенсвязывающую молекулу, образованную комбинацией, сборкой или конъюгацией таких антигенсвязывающих фрагментов. В предпочтительном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab-фрагмент.

В следующем аспекте в изобретении предложены выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, которые кодируют антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, включающие полинуклеотиды, кодирующие домены VH и/или VL антител и антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе.

В другом аспекте в настоящем документе предложен вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид или полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, функционально связанные с регуляторными последовательностями, которые обеспечивают экспрессию антитела, антигенсвязывающего фрагмента, переменного домена тяжелой цепи или переменного домена легкой цепи в клетке-хозяине или бесклеточной системе экспрессии.

В следующем аспекте в изобретении предложены клетка-хозяин или бесклеточная система экспрессии, содержащие вектор экспрессии, описанный в настоящем документе.

В настоящем документе предложен также способ получения рекомбинантного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем документе, включающий культивирование клетки-хозяина или бесклеточной системы экспрессии, описанных в настоящем документе в условиях, которые обеспечивают экспрессию антитела или антигенсвязывающего фрагмента и выделение экспрессированного антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

В другом аспекте изобретения в настоящем документе предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, или фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, в следующем аспекте предназначены для применения в качестве лекарственного препарата. В следующем аспекте предложен способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе.

Антитело, антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическая композиция можно вводить для предотвращения или лечения заболевания или состояния, связанного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10. Соответственно, заболевание или состояние может быть выбрано из группы, включающей: астму, хронический риносинусит, целиакию, гельминтную инфекцию, желудочно-кишечное эозинофильное воспаление, муковисцидоз (CF), аллергический бронхолегочный аспергиллез (ABPA), васкулит Черджа-Строса, хроническую эозинофильную пневмонию и острый миелолейкоз (AML). В предпочтительном варианте осуществления изобретения заболевание или состояние представляет собой астму. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения заболевание или состояние представляет собой муковисцидоз.

В изобретении предложено также применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем документе, для обнаружения галектина-10 в образце, полученном от пациента. Соответственно, образец пациента может представлять собой образец слизи или образец мокроты.

В изобретении также предложен набор, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе. Набор может дополнительно содержать инструкции по применению.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР**

На **фигуре 1** показаны результаты двух повторных экспериментов. Они демонстрируют, как средняя площадь лейденских кристаллов Шарко (CLC) изменяется в зависимости от времени при инкубации с гуманизированными клонами g18C06, g18E04, g18G07, g18G12, g20H09 и g23H09.

Регистрировали растворение CLC в зависимости от времени. Клоны тестировали в концентрации 250 мкг/мл (n=4) в двух независимых экспериментах, и изображения фиксировали ХЛК в образцах через 2, 5, 7 и 16 часов после добавления антител. Изображения были сегментированы с использованием алгоритма обнаружения отдельных кристаллов и была определена общая площадь кристаллов на лунку. В этом анализе 1 мкл образца антитела разводили до концентрации 1,5 мг/мл, а затем Используемая ось Y представляет собой средний процент растворенной площади кристаллов на лунку после инкубации с каждым из образцов антител. Образцы, обозначенные «T0», соответствуют эталонным образцам каждого из клонов (образцы, которые хранились при температуре -80°C перед анализом). Образцы, обозначенные «T2W», перед анализом хранились в течение 2 недель при температуре 37°C перед анализом.

На **фигуре 2** показан график, иллюстрирующий скорость растворения рекомбинантных кристаллов Шарко-Лейдена (CLC) под действием g7B07 и g24F02\_N53A (hFab), определенную с помощью конфокальной микроскопии с вращающимся диском. В качестве отрицательного контроля использовали образец, содержащий только PBS.

На **фигуре 2A** показано схематическое изображение анализа растворения рекомбинантного CLC;

На **фигуре 2B** показаны результаты анализа. Начальная площадь, покрытая CLC в начале эксперимента, была определена как 1, а поверхность, занятая CLC, определялась с помощью программного обеспечения. Образцы, обозначенные «T0», соответствуют эталонным образцам каждого из клонов (образцы, которые хранились при температуре -80°C перед анализом). Образцы, обозначенные «T2W», перед анализом хранились в течение 2 недель при температуре 37°C.

На **фигуре 3** показана концентрация белка для клонов g18C06, g20H09, g23H09, g24F02\_N53A и g7B07, определенная путем измерения оптической плотности (A) при длине волны 280 нм с использованием Nanodrop. Во избежание сомнений, хотя названия образцов на фигуре не содержат префикса «g», все тестируемые клоны представляли собой клоны с зародышевой линией. Образцы, обозначенные «T0», соответствуют эталонным образцам каждого из клонов (образцы, которые хранились при температуре -80°C перед анализом). Образцы, обозначенные «TxW+y°C», хранились в течение x недель при температуре y°C перед анализом, например, образцы, обозначенные «T1W+5°C», хранились при температуре +5°C в течение 1 недели перед анализом, Образцы, обозначенные

«T1W+25°C», хранились при температуре +25°C в течение 1 недели перед анализом, и так далее. Образцы, обозначенные «1F/FT», подвергались одному циклу замораживания-оттаивания перед анализом; образцы, обозначенные «10F/FT» подвергались 10 циклам замораживания-оттаивания перед анализом; и образцы, обозначенные «низкий pH», подвергали воздействию pH 3,7 в течение 2 часов перед анализом.

На **фигуре 4** показана относительная активность в процентах для клонов g18C06, g20H09, g23H09, g24F02\_N53A и g7B07, определенная методом поверхностного плазмонного сравнения (SPR). Во избежание сомнений, хотя названия образцов на рисунке не содержат префикса «g», все исследуемые клоны были зародышевыми клонами. Образцы, обозначенные «T0», соответствуют эталонным образцам каждого из клонов (образцы, которые хранились при температуре -80°C перед SPR анализом). Образцы, обозначенные «TxW+y°C», хранились в течение x недель при температуре y°C перед SPR анализом, например, образцы, обозначенные «T1W+5°C», хранились при температуре +5°C в течение 1 недели перед SPR анализом, образцы, обозначенные «T1W+25°C», хранились при температуре +25°C в течение 1 недели перед SPR анализом, и так далее. Образцы, обозначенные «1F/FT», подвергались одному циклу замораживания-оттаивания перед SPR анализом; образцы, обозначенные «10F/FT» подвергались 10 циклам замораживания-оттаивания перед SPR анализом; и образцы, обозначенные «низкий pH», подвергали воздействию pH 3,7 в течение 2 часов перед анализом.

На **фигуре 5** показан процент чистоты клонов g18C06, g20H09, g23H09, g24F02\_N53A и g7B07, определенный с помощью SE-HPLC. Во избежание сомнений, хотя названия образцов на рисунке не содержат префикса «g», все исследуемые клоны были зародышевыми клонами. Верхний график показывает процент мономера в каждом из образцов, средний график показывает процент общего количества агрегатов в каждом из образцов, а нижний график показывает процент общего количества фрагментов в каждом из образцов. Образцы, обозначенные «T0» соответствуют эталонным образцам каждого из клонов (образцы, которые хранились при температуре -80°C перед SE-HPLC). Образцы, обозначенные «TxW+y°C», хранились в течение x недель при температуре y°C перед SE-HPLC анализом, например, образцы, обозначенные «T1W+5°C», хранились при температуре +5°C в течение 1 недели перед SE-HPLC, образцы, обозначенные «T1W+25°C», хранились при температуре +25°C в течение 1 недели перед SE-HPLC, и так далее. Образцы, обозначенные «1F/FT», подвергались одному циклу замораживания-оттаивания перед SE-HPLC; образцы, обозначенные «10F/FT» подвергались 10 циклам замораживания-оттаивания перед SE-HPLC; и образцы, обозначенные «низкий pH», подвергали воздействию pH 3,7 в течение 2 часов перед анализом.

На **фигуре 6** показан процент чистоты клонов, оцененный с помощью капиллярного гель-электрофореза (сGE). Образцы клонов подвергались также стрессам перед определением чистоты, чтобы оценить влияние стрессов на чистоту образцов. Верхний график иллюстрирует процентную чистоту интактных Fab в невозстанавливающих условиях, а нижний график иллюстрирует процентную долю общего Fab в

восстанавливающих условиях. Образцы, обозначенные «T0» соответствуют эталонным образцам каждого из клонов ((образцы хранились при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$  перед cGE); образцы, обозначенные «T4W+5°C», хранились при температуре  $+5^{\circ}\text{C}$  в течение 4 недель перед cGE; образцы, обозначенные «T4W+25°C», хранились при температуре  $+25^{\circ}\text{C}$  в течение 4 недель перед cGE; образцы, обозначенные «T4W+37°C», хранились при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$  в течение 4 недель перед cGE; образцы, обозначенные «1F/FT», подвергались одному циклу замораживания-оттаивания перед cGE; и образцы, обозначенные «10F/FT» подвергались 10 циклам замораживания-оттаивания перед cGE анализом. Во избежание сомнений, хотя названия образцов на рисунке не содержат префикса «g», все исследуемые клоны были зародышевыми клонами.

На **фигуре 7** показано, что клоны g18C06, g20H09 и g23H09 и g24F02\_N53A растворяют кристаллы GAL10 со скоростью, сопоставимой с клоном g7B07\_N53A. Во избежание сомнений, хотя названия образцов на рисунке не содержат префикса «g», все исследуемые клоны были зародышевыми клонами.

На **фигуре 8** показано, что клоны g18C06, g20H09 и g23H09 способны растворять кристаллы GAL10. Клоны были способны растворять кристаллы GAL10 после хранения в различных условиях в течение 4 недель и после распыления. Дополнительные подробности проведенного анализа можно найти в разделе примеров, озаглавленном «Материалы и протоколы, использованные в примерах 1-4» (см. описанный там анализ 1). Во избежание сомнений, хотя названия образцов на рисунке не содержат префикса «g», все исследуемые клоны были зародышевыми клонами.

На **фигуре 9** продемонстрировано, что клоны g23H09 и g24F02\_N53A растворяют кристаллы GAL10 разного размера. Клоны были способны растворять кристаллы GAL10 после хранения при температуре  $5^{\circ}\text{C}$  в течение 4 недель и после распыления (образцы с пометкой «solo 0125»). Дополнительные подробности проведенного анализа можно найти в разделе примеров, озаглавленном «Материалы и протоколы, использованные в примерах 1-4» (см. описанный там анализ 2).

На **фигуре 10** показаны глобальные оценки риска DR бета 1 (DRB1) для 44 имеющихся на рынке терапевтических антител, а также оценки риска для клонов g20H09, g23H09, g18C06 и g24F02\_N53A. Человеческие антитела показаны средне-серыми столбцами, гуманизированные серыми и химерные темно-серыми.

На **фигуре 11** показан процент доноров с  $\text{IFN}\gamma$  (левые графики) и IL-5 (правые графики) ответом на клоны g20H09, g23H09, g18C06 и g24F02\_N53A. Для статистического анализа использовался алгоритм повторной выборки без распределения (DFR2x), а также DFReq (Moodie et al. Cancer Immunol Immunother 59, 1489-1501 (2010)). Образец KLN использовался в качестве положительного контроля.

На **фигуре 12** показаны ответы  $\text{IFN}\gamma$  (левая панель) и IL-5 (правая панель) в исследуемой популяции доноров (n=31) клонов g20H09, g23H09, g18C06 и g24F02\_N53A (для статистического анализа использовался алгоритм DFR2x (Moodie et al. Cancer Immunol Immunother 59, 1489-1501 (2010))).

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

### **А. Определения**

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники изобретения.

«**Антитело**» или «**иммуноглобулин**» - Как используется в настоящем документе, термин «иммуноглобулин» включает полипептид, имеющий комбинацию двух тяжелых и двух легких цепей, независимо от того, обладает ли он какой-либо значимой специфической иммунореактивностью или нет. «Антитела» относятся к таким комплексам, которые обладают значительной известной специфической иммунореактивной активностью по отношению к представляющему интерес антигену (в настоящем документе галектин-10). Термин «антитела к галектину-10» используется в настоящем документе для обозначения антител, которые проявляют иммунологическую специфичность в отношении белка галектина-10, включая человеческий галектин-10 и в некоторых случаях его видовые гомологи. Антитела и иммуноглобулины содержат легкие и тяжелые цепи с межцепочечной ковалентной связью или без нее. Основные структуры иммуноглобулинов в системах позвоночных относительно хорошо изучены.

Общий термин «иммуноглобулин» включает пять различных классов антител, которые можно различать биохимически. Все пять классов антител входят в объем настоящего изобретения. Следующее обсуждение, как правило, будет направлено на класс молекул иммуноглобулинов IgG. Что касается IgG, то иммуноглобулины содержат две идентичные легкие полипептидные цепи с молекулярной массой примерно 23000 дальтон и две идентичные тяжелые цепи с молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи соединены дисульфидными связями в конфигурации «Y», где легкие цепи заключают в скобки тяжелые цепи, начиная с устья «Y» и продолжаясь через переменную область.

Легкие цепи антитела классифицируются как каппа или лямбда ( $\kappa, \lambda$ ). Каждый класс тяжелых цепей может быть связан либо с легкой цепью каппа, либо с лямбда. В общем, легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, а «хвостовые» части двух тяжелых цепей связаны друг с другом ковалентными дисульфидными связями или нековалентными связями, когда иммуноглобулины генерируются гибридомами, В клетки или генетически модифицированные клетки-хозяева. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности идут от N-конца на раздвоенных концах Y-конфигурации к C-концу в нижней части каждой цепи. Специалистам в данной области техники будет понятно, что тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон ( $\gamma, \mu, \alpha, \delta, \epsilon$ ) с некоторыми подклассами среди них (например,  $\gamma 1-\gamma 4$ ). Именно природа этой цепи определяет «класс» антитела: IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.д., хорошо охарактеризованы и, как известно, придают функциональную специализацию. Модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов легко различимы



специалистом в данной области с учетом настоящего описания и, соответственно, находятся в объеме настоящего изобретения.

Как указано выше, вариабельная область антитела позволяет антителу избирательно распознавать и специфически связывать эпитопы антигенов. То есть домен VL и домен VH антитела объединяются, образуя вариабельную область, которая определяет трехмерный сайт связывания антигена. Эта четвертичная структура антитела образует сайт связывания антигена, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более конкретно, сайт связывания антигена определяется тремя комплементарно определяющими областями (CDR) на каждой из цепей VH и VL.

**«Галектин-10»** - Как используется в настоящем документе, термин «галектин-10» (или Gal10 или Gal-10, которые используются здесь взаимозаменяемо) относится к небольшому гидрофобному гликансвязывающему белку, который автокристаллизуется с образованием кристаллов Шарко-Лейдена. Галектин-10 также называют кристаллическим белком Шарко-Лейдена (CLCP), эозинофильной лизофосфолипазой и лизолецитин-ацилгидролазой. Термин «галектин-10» достаточно широк, чтобы охватить человеческий белок и гомологи любых видов. Аминокислотная последовательность полноразмерного человеческого галектина-10 представлена SEQ ID NO: 25 (см. ниже). Эта последовательность соответствует последовательности, депонированной в базе данных UniProt как человеческий галектин-10, номер доступа Q05315. Термин «галектин-10» также охватывает встречающиеся в природе варианты человеческой последовательности, например вариант Ala→Val в положении 28.

**SEQ ID NO: 25**

1	10	20	30	40	50
MSLLPVPYTE	AASLSTGSTV	TIKGRPLACF	LNEPYLQVDF	HTEMKEESDI	
	60	70	80	90	100
VFHFQVCFG	RVVMNSREY	AWKQQVESK	MPFQDGQEFE	LSISVLPDKY	
R	G	N			
	110	120	130	140	
QVMVNGQSS	TFDHRIKPEA	VKMVQVWRD	SLTKFNVSYL	KR	
Y		I			

**«Кристаллы галектина-10»** или **«кристаллы Шарко-Лейдена»** - термины «кристаллы галектина-10», «кристаллы Шарко-Лейдена» и «CLC» используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения кристаллов, образованных из галектина-10. Кристаллы, образуемые галектином-10, обычно представляют собой бипирамидальные гексагональные кристаллы, имеют длину примерно 20-40 мкм и ширину примерно 2-4 мкм. Эти кристаллы связаны с эозинофильными воспалительными заболеваниями.

**«Эпитоп»** - Как используется в настоящем документе, термин «эпитоп» означает область белка галектина-10, с которой связывается антагонист. Антагонист обычно

связывается с соответствующим эпитопом галектина-10 через комплементарный сайт связывания на антагонисте. Эпитоп, с которым связывается антагонист, обычно содержит одну или несколько аминокислот полноразмерного белка галектина-10. Эпитоп может включать аминокислоты, которые являются смежными в белке галектин-10, то есть линейный эпитоп, или может включать аминокислоты, которые являются несмежными в белке галектин-10, то есть конформационный эпитоп.

**«Сайт связывания»** - Как используется в настоящем документе, термин «сайт связывания» включает участок полипептида, который отвечает за селективное связывание с представляющим интерес целевым антигеном (например, галектином-10). Связывающие домены содержат по меньшей мере один сайт связывания. Типичные связывающие домены включают вариабельный домен антитела. Молекулы антител по настоящему изобретению могут содержать один сайт связывания или несколько (например, два, три или четыре) сайта связывания.

**«Полученный из»** - Как используется в настоящем документе, термин «полученный из» обозначенного белка (например, антитела верблюда или его антигенсвязывающего фрагмента) относится к происхождению полипептида или аминокислотной последовательности. В одном варианте осуществления изобретения полипептид или аминокислотная последовательность, полученная из конкретного исходного полипептида, представляет собой последовательность CDR или родственную ей последовательность. В одном варианте аминокислотная последовательность, полученная из конкретного исходного полипептида, не является непрерывной. Например, в одном варианте осуществления изобретения из исходного антитела получают одну, две, три, четыре, пять или шесть CDR. В одном варианте осуществления изобретения полипептид или аминокислотная последовательность, полученные из конкретного исходного полипептида или аминокислотной последовательности, имеют аминокислотную последовательность, которая по существу идентична последовательности исходной последовательности или ее части, причем эта часть состоит по меньшей мере из 3-5 аминокислот, по меньшей мере 5-10 аминокислот, по меньшей мере 10-20 аминокислот, по меньшей мере 20-30 аминокислот или по меньшей мере 30-50 аминокислот, или которая иным образом может быть идентифицирована специалистом в данной области как происходящая из исходной последовательности. В одном варианте осуществления изобретения одну или несколько последовательностей CDR, полученных из исходного антитела, изменяют для получения вариантов последовательностей CDR, например аффинные варианты, где вариантные последовательности CDR сохраняют активность связывания целевого антигена.

**«Полученные из верблюдовых»** - В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения антитела по изобретению содержат каркасные аминокислотные последовательности и/или аминокислотные последовательности CDR, полученные из обычного антитела верблюдовых или антитела V<sub>H</sub>H, полученного путем активной иммунизации верблюдовых. Однако антитела по изобретению, содержащие аминокислотные последовательности, полученные из верблюдовых, могут быть

сконструированы так, чтобы они содержали последовательности каркасной области и/или константной области, полученные из аминокислотной последовательности человека (то есть человеческого антитела) или других видов млекопитающих, не относящихся к верблюдовым. Например, в антитела к галектину-10 могут быть включены каркасная область, часть тяжелой цепи и/или шарнирная часть человека или примата, отличного от человека. В одном варианте осуществления изобретения одна или несколько аминокислот, не принадлежащих верблюдовым, могут присутствовать в каркасной области антитела, полученного из верблюдовых, например, каркасная аминокислотная последовательность, полученная из верблюдовых, может содержать одну или несколько аминокислотных мутаций, в которых присутствует соответствующий аминокислотный остаток человека или примата, отличного от человека. Кроме того, домены VH и VL, полученные из верблюдовых, или их гуманизированные варианты могут быть связаны с константными доменами человеческих антител с образованием химерной молекулы, как описано в других местах настоящего документа.

**«Антитела VHH»** - Как используется в настоящем документе, термин «антитело VHH» или «антитело только с тяжелой цепью» относится к типу антител, продуцируемому только видами семейства *Camelidae*, которые включают верблюдов, лам, альпака. Антитела, содержащие только тяжелые цепи, или антитела VHH состоят из двух тяжелых цепей и лишены легких цепей. Каждая тяжелая цепь имеет переменный домен на N-конце, и эти переменные домены называются доменами «VHH», чтобы отличить их от переменных доменов тяжелых цепей обычных гетеротетрамерных антител, то есть доменов VH, описанных выше.

**«Консервативная аминокислотная замена»** - «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. В данной области техники определены семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, несущественный аминокислотный остаток в полипептиде иммуноглобулина может быть заменен другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. В другом варианте осуществления изобретения цепочка аминокислот может быть заменена структурно сходной цепочкой, которая отличается порядком и/или составом членов семейства боковых цепей.

**«Часть тяжелой цепи»** - Как используется в настоящем документе, термин «часть тяжелой цепи» включает аминокислотные последовательности, полученные из константных доменов тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий часть

тяжелой цепи, содержит по меньшей мере одно из: домена СН1, шарнирного домена (например, верхней, средней и/или нижней шарнирной области), домена СН2, домена СН3 или его варианта или фрагмента. В одном варианте осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению может содержать Fc-часть тяжелой цепи иммуноглобулина (например, шарнирную часть, домен СН2 и домен СН3). В другом варианте осуществления изобретения в антителе или антигенсвязывающем фрагменте по настоящему изобретению может отсутствовать по меньшей мере часть константного домена (например, весь или часть домена СН2). В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один, а предпочтительно все константные домены происходят из тяжелой цепи иммуноглобулина человека. Например, в одном предпочтительном варианте осуществления изобретения часть тяжелой цепи содержит полностью человеческий шарнирный домен. В других предпочтительных вариантах осуществления изобретения часть тяжелой цепи содержит полностью человеческую часть Fc (например, шарнирные последовательности, последовательности доменов СН2 и СН3 иммуноглобулина человека).

В некоторых вариантах осуществления изобретения константные домены части тяжелой цепи происходят из разных молекул иммуноглобулина. Например, часть тяжелой цепи полипептида может содержать домен СН2, полученный из молекулы IgG1, и шарнирную область, полученную из молекулы IgG3 или IgG4. В других вариантах осуществления изобретения константные домены представляют собой химерные домены, содержащие части различных молекул иммуноглобулина. Например, шарнир может содержать первую часть молекулы IgG1 и вторую часть молекулы IgG3 или IgG4. Как изложено выше, специалисту в данной области техники будет понятно, что константные домены части тяжелой цепи могут быть модифицированы таким образом, что их аминокислотная последовательность будет отличаться от встречающейся в природе молекулы иммуноглобулина (дикого типа). То есть полипептиды по изобретению, описанные в настоящем документе, могут содержать изменения или модификации одного или нескольких константных доменов тяжелой цепи (СН1, шарнира, СН2 или СН3) и/или домена константной области легкой цепи (СL). Типичные модификации включают добавления, делеции или замены одной или нескольких аминокислот в одном или нескольких доменах.

**«Химерный»** - «Химерный» белок содержит первую аминокислотную последовательность, связанную со второй аминокислотной последовательностью, с которой он естественным образом не связан. Аминокислотные последовательности обычно могут существовать в отдельных белках, которые объединены в слитый полипептид, или они могут обычно существовать в одном и том же белке, но располагаться в новом порядке в слитом полипептиде. Химерный белок может быть создан, например, путем химического синтеза или путем создания и трансляции полинуклеотида, в котором пептидные области закодированы в желаемом соотношении. Примеры химерных антител по настоящему изобретению включают слитые белки, содержащие домены VH и VL, полученных их

верблюдовых, или их гуманизированные варианты, слитые с константными доменами человеческого антитела, например человеческие IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

«**Вариабельная область**» или «**вариабельный домен**» - Термины «вариабельная область» и «вариабельный домен» используются здесь взаимозаменяемо и имеют эквивалентное значение. Термин «вариабельный» относится к тому факту, что определенные части вариабельных доменов VH и VL сильно различаются по последовательности среди антител и используются для связывания и специфичности каждого конкретного антитела к его целевому антигену. Однако вариабельность неравномерно распределена по вариабельным доменам антител. Она сосредоточена в трех сегментах, называемых «гипервариабельными петлями», в каждом домене VL и домене VH, которые составляют часть сайта связывания антигена. Первая, вторая и третья гипервариабельные петли домена легкой цепи VLambda обозначаются в настоящем документе как L1( $\lambda$ ), L2( $\lambda$ ) и L3( $\lambda$ ) и могут быть определены как содержащие остатки 24-33 (L1( $\lambda$ ), состоящие из 9, 10 или 11 аминокислотных остатков), 49-53 (L2( $\lambda$ ), состоящий из 3 остатков) и 90-96 (L3( $\lambda$ ), состоящий из 5 остатков) в домене VL (Morea *et al.*, Methods 20:267-279 (2000)). Первая, вторая и третья гипервариабельные петли домена легкой цепи VKappa обозначаются в настоящем документе как L1( $\kappa$ ), L2( $\kappa$ ) и L3( $\kappa$ ) и могут быть определены как содержащие остатки 25-33 (L1( $\kappa$ ), состоящие из 6, 7, 8, 11, 12 или 13 остатков), 49-53 (L2( $\kappa$ ), состоящий из 3 остатков) и 90-97 (L3( $\kappa$ ), состоящий из 6 остатков) в домене VL (Morea *et al.*, Methods 20:267-279 (2000)). Первая, вторая и третья гипервариабельные петли домена VH обозначаются в настоящем документе как H1, H2 и H3 и могут быть определены как содержащие остатки 25-33 (H1, состоящий из 7, 8 или 9 остатков), 52-56 (H2, состоящий из 3 или 4 остатков) и 91-105 (H3, сильно варьирующая длина) в домене VH (Morea *et al.*, Methods 20:267-279 (2000)).

Если не указано иное, термины L1, L2 и L3 соответственно относятся к первой, второй и третьей гипервариабельным петлям домена VL и охватывают гипервариабельные петли, полученные как из изоформ Vкаппа, так и из VLambda. Термины H1, H2 и H3 соответственно относятся к первой, второй и третьей гипервариабельным петлям домена VH и охватывают гипервариабельные петли, полученные из любого из известных изоформ тяжелой цепи, включая  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$  или  $\mu$ .

Каждая из гипервариабельных петель L1, L2, L3, H1, H2 и H3 может содержать часть «области, определяющей комплементарность» или «CDR», как определено ниже. Термины «гипервариабельная петля» и «область, определяющая комплементарность» не являются строго синонимами, поскольку гипервариабельные петли (HV) определяются на основе структуры, тогда как области, определяющие комплементарность (CDR), определяются на основе вариабельности последовательности (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., 1983) и пределы HV и CDR могут быть разными в некоторых доменах VH и VL.

CDR доменов VL и VH обычно можно определить как содержащие следующие аминокислоты: остатки 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в вариабельном

домене легкой цепи и остатки 31-35 или 31-35b (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в варибельном домене тяжелой цепи; (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Таким образом, HV могут содержаться в соответствующих CDR, и ссылки здесь на «гиперварибельные петли» доменов VH и VL следует интерпретировать как включающие также соответствующие CDR, и наоборот, если не указано иное.

Более консервативные части варибельных доменов называются каркасной областью (FR), как определено ниже. Варибельные домены нативной тяжелой и легкой цепей содержат по четыре FR (FR1, FR2, FR3 и FR4 соответственно), в основном имеющие конфигурацию  $\beta$ -листа, соединенную тремя гиперварибельными петлями. Гиперварибельные петли в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью FR и вместе с гиперварибельными петлями другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта антител. Структурный анализ антител выявил взаимосвязь между последовательностью и формой сайта связывания, образованного областями, определяющими комплементарность (Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 227: 799-817 (1992)); Tramontano *et al.*, J. Mol. Biol, 215:175-182 (1990)).

«CDR» - Как используется в настоящем документе, термин «CDR» или «область, определяющая комплементарность» означает несмежные сайты связывания антигена, обнаруженные в варибельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепи. Эти конкретные области были описаны Kabat *et al.*, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977), и Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest. (1991), и Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), и MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), где определения включают перекрытие или подмножества аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Аминокислотные остатки, которые охватывают CDR, как определено в каждой из цитируемых выше ссылок, представлены для сравнения. Предпочтительно термин «CDR» представляет собой CDR, определенный Кабатом на основе сравнения последовательностей.

**Таблица 1: Определения CDR**

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

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

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

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

**«Каркасная область»** - Термин «каркасная область» или «область FR», используемый в настоящем документе, включает аминокислотные остатки, которые являются частью вариабельной области, но не являются частью CDR (например, с использованием определения CDR по Кабату). Следовательно, каркас вариабельной области имеет длину примерно 100-120 аминокислот, но включает только те аминокислоты, которые находятся за пределами CDRB конкретном примере вариабельного домена тяжелой цепи и для CDR, как определено Kabat *et al.*, каркасная область 1 соответствует домену вариабельной области, охватывающей аминокислоты 1-30; каркасная область 2 соответствует домену вариабельной области, включающему аминокислоты 36-49; каркасная область 3 соответствует домену вариабельной области, включающей аминокислоты 66-94, а каркасная область 4 соответствует домену вариабельной области от аминокислот 103 до конца вариабельной области. Каркасные области легкой цепи аналогичным образом разделены каждой из CDR вариабельной области легкой цепи. Аналогично, используя определение CDR Chothia *et al.* или McCallum *et al.*, границы каркасной области разделены соответствующими концами CDR, как описано выше. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения CDR имеют значения, определенные Kabat.

В антителах природного происхождения шесть CDR, присутствующие на каждом мономерном антителе, представляют собой короткие несмежные последовательности аминокислот, которые специфически расположены для формирования сайта связывания антигена, когда антитело принимает свою трехмерную конфигурацию в водной среде. Остальные тяжелые и легкие вариабельные домены демонстрируют меньшую межмолекулярную изменчивость аминокислотной последовательности и называются каркасными областями. Каркасные области в основном принимают конформацию  $\beta$ -листа, а CDR образуют петли, которые соединяют, а в некоторых случаях являются частью структуры  $\beta$ -листа. Таким образом, эти каркасные области действуют как каркас, который обеспечивает позиционирование шести CDR в правильной ориентации посредством межцепочечных нековалентных взаимодействий. Сайт связывания антигена, образованный расположенными CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу иммунореактивного антигена. Эта комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с эпитопом иммунореактивного антигена. Положение CDR может легко определить специалист в данной области.

**«Шарнирная область»** - Как используется в настоящем документе, термин «шарнирная область» включает часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет домен CH1 с доменом CH2. Эта шарнирная область содержит примерно 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям двигаться независимо. Шарнирные области можно подразделить на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux K.H. *et al.* J. Immunol. 161:4083-90 1998). Антитела по изобретению, содержащие «полностью человеческую» шарнирную область,

могут содержать одну из последовательностей шарнирной области, показанных в таблице 2 ниже.

**Таблица 2: Последовательности шарнирной области человека**

IgG	Верхний шарнир	Средний шарнир	Нижний шарнир
IgG1	EPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 26)	CPPCP (SEQ ID NO: 27)	APELLGGP (SEQ ID NO: 28)
IgG3	ELKTPLGDTTHT (SEQ ID NO: 29)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>3</sub> (SEQ ID NO: 30)	APELLGGP (SEQ ID NO: 31)
IgG4	ESKYGPP (SEQ ID NO: 32)	CPSCP (SEQ ID NO: 33)	APEFLGGP (SEQ ID NO: 34)
IgG42	ERK (SEQ ID NO: 35)	CCVECPPPCP (SEQ ID NO: 36)	APPVAGP (SEQ ID NO: 37)

«**Домен CH2**» - Как используется в настоящем документе, термин «домен CH2» включает часть молекулы тяжелой цепи, которая простирается, например, примерно от остатка 244 до остатка 360 антитела с использованием общепринятых схем нумерации (остатки 244-360, система нумерации Кабата; и остатки 231-340, система нумерации EU, Kabat EA *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest. Bethesda, US Department of Health and Human Services, NIH. 1991). Домен CH2 уникален тем, что он не связан тесно с другим доменом. Скорее, две N-связанные разветвленные углеводные цепи расположены между двумя доменами CH2 интактной нативной молекулы IgG. Также хорошо известно, что домен CH3 простирается от домена CH2 до C-конца молекулы IgG и включает примерно 108 остатков.

«**Фрагмент**» - Термин «фрагмент», используемый в контексте антител по изобретению, относится к части или части антитела или цепи антитела, содержащей меньшее количество аминокислотных остатков, чем интактное или полное антитело или цепь антитела. Термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к полипептидному фрагменту иммуноглобулина или антитела, который связывает антиген или конкурирует с интактным антителом (то есть с интактным антителом, из которого они были получены) за связывание антигена (то есть специфическое связывание с галектином-10). Как используется в настоящем документе, термин «фрагмент» молекулы антитела включает антигенсвязывающие фрагменты антител, например, переменный домен легкой цепи антитела (VL), переменный домен тяжелой цепи антитела (VH), одноцепочечное антитело (scFv), фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, Fab-фрагмент, Fd фрагмент, Fv фрагмент, однорукое (одновалентное) антитело, диатела, триатела, тетратела или любую антигенсвязывающую молекулу, образованную комбинацией, сборкой или конъюгацией таких антигенсвязывающих фрагментов. Термин «антигенсвязывающий фрагмент», как используется в настоящем документе, дополнительно предназначен для охвата фрагментов антител, выбранных из группы, состоящей из монотел, доменных антител и нанотел.



Фрагменты можно получить, например, посредством химической или ферментативной обработки интактного или полного антитела или цепи антитела или рекомбинантными способами.

«**Fab**» - «Fab» или «фрагмент Fab» относится к молекуле, состоящей из тяжелой цепи и легкой цепи, где легкая цепь состоит из домена VL и одного константного домена (CL, Ск или Сλ) и тяжелой цепи, состоит только из домена VH и домена CH1. Fab-фрагмент обычно представляет собой одно плечо Y-образной молекулы иммуноглобулина. Fab-фрагмент может быть получен из молекулы иммуноглобулина под действием фермента папаина. Папаин расщепляет молекулы иммуноглобулина в шарнирной области с образованием двух Fab-фрагментов и отдельной Fc-области.

«**scFv**» или «**scFv фрагмент**» - scFv или фрагмент scFv означает одноцепочечный переменный фрагмент. scFv представляет собой слитый белок домена VH и домена VL антитела, соединенных посредством линкера.

«**Валентность**» - Как используется в настоящем документе, термин «валентность» относится к числу потенциальных сайтов связывания с мишенью в полипептиде. Каждый сайт связывания-мишени специфически связывает одну молекулу-мишень или конкретный сайт на молекуле-мишени. Когда полипептид содержит более одного сайта связывания-мишени, каждый сайт связывания-мишени может специфически связывать одну и ту же или разные молекулы (например, может связываться с разными лигандами или разными антигенами или разными эпитопами одного и того же антигена).

«**Специфичность**» - Термин «специфичность» относится к способности связываться (например, иммунореагировать с) заданной мишенью, например, галектином-10. Полипептид может быть моноспецифичным и содержать один или несколько сайтов связывания, которые специфически связывают мишень, или полипептид может быть мультиспецифичным и содержать два или более сайтов связывания, которые специфически связывают одну и ту же или разные мишени.

«**Синтетический**» - Как используется в настоящем документе, термин «синтетический» по отношению к полипептидам включает полипептиды, которые содержат аминокислотную последовательность, не встречающуюся в природе. Например, полипептиды неприродного происхождения, которые представляют собой модифицированные формы встречающихся в природе полипептидов (например, содержащие мутацию, такую как добавление, замена или делеция) или которые содержат первую аминокислотную последовательность (которая может встречаться или не встречаться в природе), которая связана в линейной последовательности аминокислот со второй аминокислотной последовательностью (которая может встречаться или не встречаться в природе), с которой она не связана в природе.

«**Сконструированный**» - Как используется в настоящем документе, термин «сконструированный» включает манипулирование молекулами нуклеиновой кислоты или полипептида синтетическими средствами (например, с помощью рекомбинантных методов, синтеза пептидов *in vitro*, путем ферментативного или химического связывания пептидов

или некоторой комбинации этих методов). Предпочтительно, антитела по изобретению являются сконструированными, включая, например, гуманизированные и/или химерные антитела, а также антитела, которые были сконструированы для улучшения одного или нескольких свойств, таких как связывание антигена, стабильность/период полураспада, иммуногенность или эффекторная функция.

**«Модифицированное антитело»** - Как используется в настоящем документе, термин «модифицированное антитело» включает синтетические формы антител, которые изменены таким образом, что они не встречаются в природе, например, антитела, которые содержат по меньшей мере две части тяжелой цепи, но не две полные тяжелые цепи (такие как, например, антитела или минитела с удаленным доменом); мультиспецифические формы антител (например, биспецифические, триспецифические и т.д.), измененные для связывания с двумя или более разными антигенами или с разными эпитопами на одном антигене); молекулы тяжелой цепи, присоединенные к молекулам scFv и тому подобное. Молекулы scFv известны в данной области и описаны, например, в патенте США 5892019. Кроме того, термин «модифицированное антитело» включает поливалентные формы антител (например, трехвалентные, четырехвалентные и т.д. антитела, которые связываются с тремя или более копиями одного и того же антигена). В другом варианте осуществления изобретения модифицированное антитело по изобретению представляет собой слитый белок, содержащий по меньшей мере одну часть тяжелой цепи, лишенную домена CH2 и содержащий связывающий домен полипептида, содержащего связывающую часть одного члена пары рецептор-лиганд.

Термин «модифицированное антитело» также может использоваться в настоящем документе для обозначения вариантов аминокислотной последовательности антител по изобретению, структурно определенных в настоящем документе. Специалисту в данной области техники будет понятно, что антитело может быть модифицировано для получения варианта антитела, аминокислотная последовательность которого варьируется по сравнению с антителом, из которого оно было получено. Например, могут быть произведены замены нуклеотидов или аминокислот, приводящие к консервативным заменам или изменениям в «заменяемых» аминокислотных остатках (например, в CDR и/или каркасных остатках). Аминокислотные замены могут включать замену одной или нескольких аминокислот на встречающуюся в природе или неприродную аминокислоту.

**«Гуманизирующие замены»** - Как используется в настоящем документе, термин «гуманизирующие замены» относится к аминокислотным заменам, при которых аминокислотный остаток присутствует в определенном положении в домене VH или VL антитела (например, антитело к галектину-10 полученного из верблюдовых), заменяется аминокислотным остатком, который находится в эквивалентном положении в эталонном VH или VH человека. Эталонный домен VH или VL человека может представлять собой домен VH или VL, кодируемый зародышевой линией человека. Гуманизирующие замены могут быть сделаны в каркасных областях и/или CDR антител, определенных в настоящем документе.

**«Гуманизированные варианты»** - Как используется в настоящем документе, термин «гуманизированный вариант» относится к варианту антитела, которое содержит одну или несколько «гуманизированных замен» по сравнению с эталонным антителом, где часть эталонного антитела (например, домен VH и/или Домен VL или его части, содержащие по меньшей мере один CDR), содержат аминокислоту, полученную из вида, отличного от человека, и «гуманизирующие замены» происходят в аминокислотной последовательности, полученной из вида, отличного от человека.

**«Зародышевые варианты»** - Термин «зародышевый вариант» используется в настоящем документе для обозначения «гуманизированных вариантов», в которых «гуманизированные замены» приводят к замене одного или нескольких аминокислотных остатков, присутствующих в определенном положении(ях) в домене VH или VL антитела (например, антитела к галектину-10, полученного из верблюдовых) аминокислотным остатком, который находится в эквивалентном положении в эталонном домене VH или VL человека, кодируемом зародышевой линией человека. Типично, что для любого данного «варианта зародышевой линии» замещающие аминокислотные остатки, заменяемые в варианте зародышевой линии, берутся исключительно или преимущественно из одного домена VH или VL, кодируемого зародышевой линией человека. Термины «гуманизированный вариант» и «зародышевый вариант» часто используются в настоящем документе как взаимозаменяемые. Введение одной или более «гуманизированных замен» в домен VH или VL, полученный из верблюдовых (например, из ламы), приводит к получению «гуманизированного варианта» домена VH или VL, полученного из верблюдовых (ламы). Если аминокислотные остатки, замененные в, происходят преимущественно или исключительно из одной последовательности домена VH или VL, кодируемой зародышевой линией человека, то результатом может быть «вариант зародышевой линии человека» домена VH или VL, полученного из верблюдовых (ламы).

**«% идентичности»** - Как используется в настоящем документе, термин предназначен для описания сходства последовательностей между двумя последовательностями, такими как аминокислотные и нуклеотидные последовательности. Это можно определить путем сравнения двух последовательностей, выровненных оптимальным образом, при этом сравниваемая аминокислотная последовательность может содержать добавления или делеции по отношению к эталонной последовательности для оптимального выравнивания между этими двумя последовательностями. Процент идентичности рассчитывают путем определения количества идентичных позиций, для которых остаток идентичен между двумя последовательностями, деления этого количества идентичных позиций на общее количество позиций в окне сравнения и умножения полученного результата на 100, чтобы получить процент идентичности между этими двумя последовательностями. Например, можно использовать программу BLAST, «BLAST 2 последовательности» (Tatusova et al, «Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences», FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) доступную на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, используемые параметры заданы по умолчанию (в

частности, для параметров « штраф за открытие делеции»: 5, и «штраф за расширение делеции»: 2; выбранной матрицей является, например, матрица «BLOSUM 62», предложенная программой), процент идентичности между двумя сравниваемыми последовательностями рассчитывается непосредственно программой.

**«Аффинные варианты»** - Как используется в настоящем документе, термин «аффинный вариант» относится к варианту антитела, которое демонстрирует одно или несколько изменений в аминокислотной последовательности по сравнению с эталонным антителом, при этом аффинный вариант демонстрирует измененную аффинность к целевому антигену по сравнению с эталонным антителом. Например, аффинные варианты будут проявлять измененную аффинность к галектину-10 по сравнению с эталонным антителом к галектину-10. Аффинный вариант будет проявлять улучшенное сродство к целевому антигену, например, галектину-10, по сравнению с эталонным антителом. Аффинные варианты обычно демонстрируют одно или несколько изменений в аминокислотной последовательности в CDR по сравнению с эталонным антителом. Такие замены могут привести к замене исходной аминокислоты, присутствующей в данном положении в CDR, другим аминокислотным остатком, который может быть аминокислотным остатком природного происхождения или аминокислотным остатком неприродного происхождения. Аминокислотные замены могут быть консервативными или неконсервативными.

**«Высокая гомология человека»** - Антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), можно рассматривать как имеющее высокую гомологию с человеком, если домены VH и домены VL, взятые вместе, демонстрируют по меньшей мере 90% идентичности аминокислотной последовательности с наиболее близко совпадающие последовательности VH и VL зародышевой линии человека. Антитела, имеющие высокую гомологию с человеком, могут включать антитела, содержащие домены VH и VL нативных антител, не принадлежащих человеку, которые демонстрируют достаточно высокий % идентичности последовательностей с последовательностями зародышевой линии человека, включая, например, антитела, содержащие домены VH и VL обычных антител верблюдовых, а также сконструированные, особенно гуманизированные или зародышевые варианты таких антител, а также «полностью человеческие» антитела.

В одном варианте осуществления изобретения домен VH антитела с высокой человеческой гомологией может демонстрировать идентичность аминокислотной последовательности или гомологию последовательности 80% или более с одним или несколькими доменами VH человека в каркасных областях FR1, FR2, FR3 и FR4. В других вариантах осуществления изобретения идентичность аминокислотной последовательности или гомология последовательности между доменом VH полипептида по изобретению и наиболее совпадающей последовательностью домена VH зародышевой линии человека может составлять 85% или более, 90% или более, 95% или более, 97% или более, или до 99% или даже 100%.

В одном варианте осуществления изобретения домен VH антитела с высокой гомологией человека может содержать одно или несколько (например, от 1 до 10) несоответствий аминокислотной последовательности в каркасных областях FR1, FR2, FR3 и FR4 по сравнению с наиболее близким совпадающим человеческим VH последовательность.

В другом варианте осуществления изобретения домен VL антитела с высокой человеческой гомологией может демонстрировать идентичность последовательности или гомологию последовательности 80% или более с одним или несколькими доменами VL человека в каркасных областях FR1, FR2, FR3 и FR4. В других вариантах осуществления изобретения идентичность аминокислотной последовательности или последовательность гомология последовательности между доменом VL полипептида по изобретению и наиболее совпадающей последовательностью домена VL зародышевой линии человека может составлять 85% или более 90% или более, 95% или более, 97% или более или вплоть до 99% или даже 100%.

В одном варианте осуществления изобретения домен VL антитела с высокой гомологией человека может содержать одно или несколько (например, от 1 до 10) несоответствий аминокислотной последовательности в каркасных областях FR1, FR2, FR3 и FR4 по сравнению с наиболее близкой совпадающей последовательностью VL человека.

#### **В. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, связывающиеся с галектином-10**

Как описано выше, настоящее изобретение относится к антителам или антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с галектином-10. Термин «антитело» используется в самом широком смысле и охватывает, помимо прочего, моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (то есть биспецифические антитела), при условии, что они проявляют соответствующую иммунологическую специфичность к белку галектину-10. Описанный в настоящем документе антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с галектином-10, могут проявлять иммунологическую специфичность в отношении любого эпитопа галектина-10.

Термин «моноклональное антитело», как используется в настоящем документе, относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, то есть отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела высокоспецифичны и направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от традиционных препаратов (поликлональных) антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов) антигена, каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты или эпитопа антигена. «Фрагменты антитела» или «антигенсвязывающие фрагменты» содержат часть полноразмерного антитела, обычно его антигенсвязывающий или переменный домен. Фрагменты антител описаны в других местах настоящего

документа, и примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, биспецифические фрагменты Fab и F<sub>v</sub>, диатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител (см. Holliger and Hudson, Nature Biotechnol. 23:1126-36 (2005), содержание которого включено в настоящий документ в качестве ссылки).

Описанные в настоящем документе антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают галектин-10, предназначены для терапевтического применения у человека и, следовательно, обычно представляют собой иммуноглобулины типа IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, часто типа IgG, в этом случае они могут принадлежать к любому из четырех подклассов IgG1, IgG2a и b, IgG3 или IgG4. В предпочтительных вариантах антитела представляют собой антитела IgG. Предпочтительны моноклональные антитела, поскольку они высокоспецифичны и направлены против одного антигенного сайта. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают галектин-10, представляют собой Fab-фрагменты или «Fab».

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают галектин-10, могут проявлять высокую гомологию с человеком, как определено в настоящем документе в другом месте. Такие молекулы антител, имеющие высокую гомологию с человеком, могут включать антитела, содержащие домены VH и VL нативных антител, не принадлежащих человеку, которые демонстрируют достаточно высокий процент идентичности последовательностей с последовательностями зародышевой линии человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой гуманизированные или зародышевые варианты антител нечеловеческого происхождения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные в настоящем документе антитела могут быть получены из верблюдовых. Антитела, полученные из верблюдовых, могут представлять собой антитела только с тяжелой цепью, то есть антитела V<sub>HH</sub>, или могут представлять собой обычные гетеротетрамерные антитела. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения антитела к галектину-10 и антигенсвязывающие фрагменты получены из гетеротетрамерных антител верблюдовых. В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления изобретения антитела к галектину-10 получены из V<sub>HH</sub> антител.

Например, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут быть выбраны из иммунных библиотек, полученных способом, включающим стадию иммунизации верблюдовых целевой мишенью, то есть галектином-10. Верблюдовых можно иммунизировать целевым белком или его полипептидным фрагментом, или молекулой мРНК или молекулой кДНК, экспрессирующей белок или его полипептидный фрагмент. Способы получения антител у видов верблюдовых и отбора антител против предпочтительных мишеней из иммунных библиотек верблюдовых

описаны, например, в международной заявке на патент № WO2010/001251, включенный в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены из верблюдовых, поскольку они содержат по меньшей мере одну гипервариабельную (HV) петлю или область, определяющую комплементарность (CDR), полученную из домена VH или домена VL вида семейства Camelidae. В частности, антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут содержать домены VH и/или VL или их CDR, полученные путем активной иммунизации беспородных верблюдовых, то есть Памас, галектином-10.

Термин «полученный из» в этом контексте подразумевает структурное родство в том смысле, что HV или CDR антител воплощают аминокислотную последовательность (или ее минорные варианты), которая первоначально кодировалась геном иммуноглобулина Camelidae. Однако это не обязательно подразумевает особую взаимосвязь с точки зрения процесса производства, используемого для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

Происходящее из верблюжьих антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены из любых видов верблюдовых, включая, среди прочего, иламу, дромадера, альпаку, викунью, гуанако или верблюда.

Молекулы антител, содержащие домены VH и VL верблюжьего происхождения или их CDR, обычно представляют собой рекомбинантно экспрессируемые полипептиды и могут быть химерными полипептидами. Термин «химерный полипептид» относится к искусственному (не встречающемуся в природе) полипептиду, который создается путем сопоставления двух или более пептидных фрагментов, которые в противном случае не встречаются рядом. В это определение включены «видовые» химерные полипептиды, созданные путем сопоставления пептидных фрагментов, кодируемых двумя или более видами, то есть верблюдовыми и человеком.

В некоторых вариантах осуществления изобретения весь домен VH и/или весь домен VL можно получить из видов семейства Camelidae. Домен VH, полученный из верблюдовых, и/или домен VL, полученный из верблюдовых, затем может быть подвергнут белковому конструированию, при котором в аминокислотную последовательность верблюдовых вводятся одна или несколько аминокислотных замен, вставок или делеций.

Эти сконструированные изменения предпочтительно включают аминокислотные замены относительно последовательности верблюдовых. Такие изменения включают «гуманизацию» или «зародышевую линию», при которой один или несколько аминокислотных остатков в домене VH или VL, кодируемом верблюдовыми, заменяются эквивалентными остатками из гомологичного домена VH или VL, кодируемого геном человека.

Выделенные домены VH и VL верблюдовых, полученные путем активной иммунизации верблюдовых (то есть Памас) галектином-10, можно использовать в качестве основы для конструирования антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые

связывают галктин-10 в соответствии с настоящим изобретением. Начиная с интактных доменов VH и VL верблюдовых, можно сконструировать одну или несколько аминокислотных замен, вставок или делеций, которые отклоняются от исходной последовательности верблюдовых. В некоторых вариантах осуществления изобретения такие замены, вставки или делеции могут присутствовать в каркасных областях домена VH и/или домена VL.

В других вариантах осуществления изобретения предложены «химерные» молекулы антител, содержащие домены VH и VL верблюдовых (или их сконструированные варианты) и один или несколько константных доменов из антитела, не относящегося к верблюдовым, например, константные домены, кодируемые геном человека (или их сконструированные варианты). В таких вариантах осуществления изобретения предпочтительно, чтобы и домен VH, и домен VL были получены из одного и того же вида верблюдовых, например, как VH, так и VL могут быть от *Lama glama* или как VH, так и VL могут быть от *Lama pacos* (до введения сконструированной вариации аминокислотной последовательности). В таких вариантах осуществления изобретения как домен VH, так и домен VL могут быть получены от одного животного, в частности, от одного животного, которое было активно иммунизировано интересующим антигеном.

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

В неограничивающих вариантах осуществления изобретения антитела, описанные в настоящем документе могут содержать домены CH1 и/или домены CL (из тяжелой цепи и легкой цепи соответственно), аминокислотная последовательность которых полностью или по существу является человеческой. Для молекул антител, предназначенных для терапевтического применения у человека, типично, что вся константная область антитела или по меньшей мере ее часть имеет полностью или практически аминокислотную последовательность человека. Следовательно, один или более или любая комбинация домена CH1, шарнирной области, домена CH2, домена CH3 и домена CL (и домена CH4, если он присутствует) может быть полностью или по существу человеческим в отношении его аминокислотной последовательности. Домен CH1, шарнирная область, домен CH2, домен CH3 и/или домен CL (и/или домен CH4, если он присутствует) могут быть получены из человеческого антитела, предпочтительно, человеческого антитела IgG, более предпочтительно, человеческого антитела IgG1 подтипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Преимущественно домен CH1, шарнирная область, домен CH2, домен CH3 и домен CL (и домен CH4, если он присутствует) могут полностью или по существу иметь аминокислотную последовательность человека. В контексте константной области гуманизированного или химерного антитела или фрагмента антитела термин «по существу человеческий» относится к идентичности аминокислотной последовательности по меньшей



мере 90%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 99% с константной областью человека. Термин «аминокислотная последовательность человека» в этом контексте относится к аминокислотной последовательности, которая кодируется геном иммуноглобулина человека, который включает гены зародышевой линии, перестроенные и соматически мутировавшие гены. Изобретение также относится к полипептидам, содержащим константные домены «человеческой» последовательности, которые были изменены путем добавления, делеции или замены одной или нескольких аминокислот по отношению к человеческой последовательности, за исключением тех вариантов реализации, в которых присутствует «полностью человеческая» шарнирная область. является явно обязательным.

Антитела, связывающие галектин-10, могут иметь одну или несколько аминокислотных замен, вставок или делеций в константной области тяжелой и/или легкой цепи, особенно в области Fc. Аминокислотные замены могут привести к замене замененной аминокислоты другой встречающейся в природе аминокислотой или неприродной или модифицированной аминокислотой. Допускаются также другие структурные модификации, такие как, например, изменения в характере гликозилирования (например, путем добавления или удаления N- или O-связанных сайтов гликозилирования).

Антитела могут быть модифицированы в области Fc для увеличения аффинности связывания с неонатальным рецептором FcRn. Повышенную аффинность связывания можно измерить при кислом pH (например, от примерно pH 5,5 до примерно pH 6,0). Повышенную аффинность связывания также можно измерить при нейтральном pH (например, от примерно pH 6,9 до примерно pH 7,4). Под «повышенной аффинностью связывания» подразумевают повышенную аффинность связывания с FcRn по сравнению с немодифицированной областью Fc. Обычно немодифицированная область Fc будет обладать аминокислотной последовательностью дикого типа человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В таких вариантах реализации повышенная аффинность связывания FcRn молекулы антитела, имеющей модифицированную область Fc, будет измеряться относительно аффинности связывания IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа с FcRn.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько аминокислотных остатков в области Fc могут быть заменены другой аминокислотой, чтобы усилить связывание с FcRn. Сообщалось о нескольких заменах Fc, которые усиливают связывание FcRn и тем самым улучшают фармакокинетику антител. Такие замены описаны, например, в работах Zalevsky et al. (2010) *Nat. Biotechnol.* 28(2):157-9; Hinton et al. (2006) *J Immunol.* 176:346-356; Yeung et al. (2009) *J Immunol.* 182:7663-7671; Presta LG. (2008) *Curr. Opin. Immunol.* 20:460-470; и Vaccaro et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23(10):1283-88, содержание которых включено в настоящий документ в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела содержат модифицированный домен Fc человеческого IgG, содержащий или состоящий из аминокислотных замен H433K и N434F, где нумерация домена Fc соответствует нумерации EC (Edelman, G.M. et al., *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969), и Kabat, E.A.; National

Institutes of Health (U.S.) Office of the Director. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed.; DIANE Publishing: Collingdale, PA, USA, (1991)). В дополнительном варианте осуществления изобретения антитела, описанные в настоящем документе, содержат модифицированный домен Fc человеческого IgG, содержащий или состоящий из аминокислотных замен M252Y, S254T, T256E, H433K и N434F, причем нумерация домена Fc соответствует нумерации ЕС. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения предложены антитела, которые связываются с галектином-10 (то есть анти-антитела к галектину-10), где антитела содержат по меньшей мере один вариант домена Fc, включающий технологию ABDEG<sup>TM</sup>. Антитела ABDEG<sup>TM</sup> антитела и антагонисты FcRn, включающие технологию ABDEG<sup>TM</sup>, были описаны для лечения заболеваний, опосредованных антителами, таких как аутоиммунные заболевания (см. WO2006/130834 и WO2015/100299, включенные в настоящий документ посредством ссылки).

Дополнительные изменения домена Fc, которые могут быть включены в варианты доменов Fc или связывающих фрагментов FcRn, также включают, без ограничений, те, которые описаны в работах Ghetie et al., 1997, *Nat. Biotech.* 15:637-40; Duncan et al, 1988, *Nature* 332:563-564; Lund et al., 1991, *J. Immunol.*, 147:2657-2662; Lund et al, 1992, *Mol. Immunol.*, 29:53-59; Alegre et al, 1994, *Transplantation* 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, *Proc Natl. Acad Sci USA*, 92:11980-11984; Jefferis et al, 1995, *Immunol Lett.*, 44:111-117; Lund et al., 1995, *Faseb J.*, 9:115-119; Jefferis et al, 1996, *Immunol Lett.*, 54:101-104; Lund et al, 1996, *J. Immunol.*, 157:4963-4969; Armour et al., 1999, *Eur J Immunol.* 29:2613-2624; Idusogie et al, 2000, *J. Immunol.*, 164:4178-4184; Reddy et al, 2000, *J. Immunol.*, 164:1925-1933; Xu et al., 2000, *Cell Immunol.*, 200:16-26; Idusogie et al, 2001, *J. Immunol.*, 166:2571-2575; Shields et al., 2001, *J Biol. Chem.*, 276:6591-6604; Jefferis et al, 2002, *Immunol Lett.*, 82:57-65; Presta et al., 2002, *Biochem Soc Trans.*, 30:487-490); патентах США №№ 5624821, 5885573, 5677425, 6165745, 6277375, 5869046, 6121022, 5624821, 5648260, 6528624, 6194551, 6737056, 6821505, 6277375, публикациях патентов США №№ 2004/0002587 и публикациях РСТ WO 94/29351, WO 99/58572, WO 00/42072, WO 02/060919; WO 04/029207, WO 04/099249, WO 04/063351, содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, описанные в настоящем документе, содержат модифицированный домен Fc человеческого IgG, состоящий из до 2, до 3, до 4, до 5, до 6, до 7, до 8, до 9, до 10, до 12, до 15, до 20 замен относительно соответствующей последовательности IgG дикого типа.

Любое из антител к галектину-10, описанных в настоящем документе, может демонстрировать pH-зависимое связывание антигена, т.е. pH-зависимое связывание с галектином-10.

Антитела, связавшие антиген, попадают в клетки и направляются по пути эндосомально-лизосомальной деградации. Антитела, которые способны диссоциировать от своего антигена в ранней эндосоме, могут быть возвращены обратно на поверхность клетки.

Антитела, которые с высоким сродством связываются со своим антигеном в эндосомальных компартментах, обычно передаются в лизосомы для деградации. Ранее было показано, что если антитело обладает рН-зависимой антигенсвязывающей активностью, то есть оно имеет более низкую аффинность связывания своего антигена при раннем эндосомальном рН по сравнению с рН плазмы, антитело будет более эффективно рециклироваться на клеточной поверхности. Это может продлить период полувыведения антитела из плазмы и позволить одному и тому же антителу связываться с несколькими антигенами. По этой причине для описанных в настоящем документе антител против галектина-10 выгодно проявлять рН-зависимое связывание антигена. рН-зависимые антитела против галектина-10 в соответствии с настоящим изобретением обладают потенциалом элиминировать галектин-10 путем связывания с этим белком. Галектин-10 затем может высвобождаться в кислом эндосомальном компартменте и направляться в лизосомы для деградации. Свободные антитела против галектина-10 по изобретению затем могут быть повторно использованы на поверхности клетки, чтобы они могли связывать и интернализировать дополнительный галектин-10.

Антитела против галектина-10 по изобретению могут обладать собственной рН-зависимой антигенсвязывающей активностью, т.е. они могут быть выбраны по этому свойству. Альтернативно или в дополнение, описанные здесь антитела против галектина-10 могут быть сконструированы таким образом, чтобы они демонстрировали зависимое от рН связывание с мишенью. Способы конструирования рН-зависимой антигенсвязывающей активности в молекулах антител описаны, например, в EP2275443, который включен сюда в качестве ссылки. Способы сконструированного рН-зависимого связывания антигена в молекулах антител также описаны в WO2018/206748, включенной в настоящий документ посредством ссылки. Антитела, описанные в настоящем документе, могут быть модифицированы любым способом для достижения рН-зависимого связывания. Например, антитела могут быть модифицированы в соответствии со способами, описанными в EP2275443 или WO2018/206748, так, чтобы они проявляли рН-зависимое связывание антигена.

Для рН-зависимых вариантов осуществления изобретения антител против галектина-10, описанных в настоящем документе, антигенсвязывающая активность ниже при эндосомальном рН по сравнению с антигенсвязывающей активностью при рН плазмы. Эндосомальный рН обычно кислый, тогда как рН плазмы обычно нейтральный. Соответственно, антитела, описанные в настоящем документе, могут проявлять рН-зависимое связывание антигена, так что их антигенсвязывающая активность ниже при кислом рН по сравнению с антигенсвязывающей активностью при нейтральном рН. Эндосомальный рН или «кислый рН» может представлять собой рН от около рН 4,0 до около рН 6,5, предпочтительно, от около рН 5,5 до около рН 6,5, предпочтительно, от около рН 5,5 до около рН 6,0, предпочтительно, рН 5,5, рН 5,6, рН 5,7 или рН 5,8. рН плазмы или «нейтральный рН» может представлять собой рН от около рН 6,9 до около рН 8,0,

предпочтительно, от около рН 7,0 до около рН 8,0, предпочтительно, от около рН 7,0 до около рН 7,4, предпочтительно, рН 7,0 или рН 7,4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела против галектина-10 демонстрируют рН-зависимое связывание, так что антигенсвязывающая активность при рН 5,8 ниже по сравнению с антигенсвязывающей активностью при рН 7,4. рН-зависимые антитела против галектина-10 могут характеризоваться тем, что константа диссоциации (KD) для взаимодействия антитело-антиген при кислом рН или рН 5,8 выше, чем константа диссоциации (KD) для взаимодействия антитело-антиген при нейтральном уровне. рН или при рН 7,4. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела против галектина-10 демонстрируют рН-зависимое связывание, так что соотношение KD для антигена при рН 5,8 и KD для антигена при рН 7,4 ( $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ ) равно 2 и более, 4 и более, 6 и более, 8 и более, 10 и более, 12 и более.

Зависимую от рН антигенсвязывающую активность молекулы антитела можно создать путем модификации молекулы антитела таким образом, чтобы ухудшить способность связывания антигена при кислом рН и/или повысить способность связывания антигена при нейтральном рН. Например, молекула антитела может быть модифицирована путем замены по меньшей мере одной аминокислоты молекулы антитела на гистидин или путем вставки по меньшей мере одного гистидина в молекулу антитела. Такие сайты мутации (замены или вставки) гистидина особым образом не ограничены, и любой сайт приемлем при условии, что антигенсвязывающая активность при рН эндосом (например, рН 5,8) ниже, чем активность при рН плазмы (например, рН 7,4), как по сравнению с тем, что было до мутации или вставки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти- антитела к галектину-10 могут быть сконструированы так, чтобы проявлять рН-зависимое связывание антигена путем введения одной или нескольких замен в переменные домены. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения антитела против галектина-10 сконструированы так, чтобы проявлять рН-зависимое связывание антигена путем введения одной или нескольких замен в один или несколько CDR антитела. Замены могут вводить один или несколько остатков His в один или несколько сайтов переменных доменов, предпочтительно CDR тяжелой цепи и/или легкой цепи, чтобы обеспечить рН-зависимое связывание антигена.

В вариантах осуществления изобретения, в которых антитело содержит три последовательности CDR тяжелой цепи и три последовательности CDR легкой цепи, шесть объединенных CDR могут состоять в общей сложности из 1-10 замен His, необязательно 1-5 замен His, необязательно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 замен His. Антитела против галектина-10 могут быть сконструированы в соответствии со способами, описанными в WO2018/206748, включенными в настоящий документ в качестве ссылки. Негистидиновые замены также могут быть включены в переменные домены, особенно CDR, рН-зависимых антител, описанных в настоящем документе.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения типовые антитела против галектина-10, имеющие конкретные последовательности доменов CDR, VH и/или

VL, перечисленные в настоящем документе, сконструированы таким образом, что они демонстрируют рН-зависимое связывание антигена. Например, последовательности CDR типичных антител против галектина-10, описанных в настоящем документе, могут быть модифицированы путем введения одной или нескольких гистидиновых замен для получения антител, демонстрирующих рН-зависимое связывание антигена.

Антитела, описанные в настоящем документе, также могут быть модифицированы таким образом, чтобы образовывать иммуноконъюгаты, содержащие антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический агент, токсин (то есть ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или его фрагменты) или радиоактивный изотоп (то есть радиоконъюгат). Fc-области также могут быть сконструированы для продления периода полураспада, как описано в работе Chan and Carter (2010) *Nature Reviews: Immunology* 10:301-316, выключенной в настоящий документ в качестве ссылки.

В еще одном варианте осуществления область Fc модифицируется для увеличения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для увеличения аффинности антитела к рецептору Fc $\gamma$  путем модификации одной или нескольких аминокислот.

В конкретных вариантах осуществления изобретения область Fc может быть сконструирована таким образом, чтобы не иметь эффекторной функции. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело молекулы антител по изобретению могут иметь область Fc, полученную из встречающихся в природе изотипов IgG, имеющих пониженную эффекторную функцию, например IgG4. Fc-области, полученные из IgG4, могут быть дополнительно модифицированы для повышения терапевтической полезности, например, путем введения модификаций, которые минимизируют обмен плечами между молекулами IgG4 *in vivo*. Fc-области, полученные из IgG4, могут быть модифицированы для включения замены S228P.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы антител модифицированы в отношении гликозилирования. Например, можно получить агликозилированное антитело (т.е. антитело лишено гликозилирования). Гликозилирование можно изменить, например, для увеличения аффинности антитела к целевому антигену. Такие модификации углеводов могут быть достигнуты путем; например, изменение одного или нескольких сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно произвести одну или несколько аминокислотных замен, которые приводят к устранению одного или нескольких сайтов гликозилирования каркасной области варибельной области, тем самым устраняя гликозилирование в этом сайте. Такое агликозилирование может повысить аффинность антитела к антигену.

Также предусмотрены варианты антител, которые связывают галектин-10, имеющие измененный тип гликозилирования, такие как гипофукозилированные антитела, имеющие уменьшенное количество фукозильных остатков, или полностью или частично дефукозилированные антитела (как описано Natsume et al., *Drug Design Development and*

Therapy, Vol.3, pp7-16, 2009) или антитело, имеющее увеличенную структуру GlcNac, делящуюся пополам. Было продемонстрировано, что такие измененные паттерны гликозилирования увеличивают активность ADCC антител, обычно вызывая 10-кратное усиление ADCC по сравнению с эквивалентным антителом, содержащим «нативный» домен Fc человека. Такие модификации углеводов можно осуществить, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным ферментативным механизмом гликозилирования (как описано Yamane-Ohnuki and Satoh, mAbs 1:3, 230-236, 2009). Примерами нефукозилированных антител с усиленной функцией ADCC являются антитела, полученные с использованием технологии Potelligent™ компании BioWa Inc.

### **С. Типичные антитела, которые связываются с галектином-10**

В настоящем изобретении предложены типичные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с галектином-10. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут быть определены исключительно в отношении их структурных характеристик, как описано ниже.

#### **[клон g24F02\_N53A]**

В настоящем документе предложены антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит последовательности CDR HCDR3, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 2; HCDR2, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 3; HCDR1, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 1; и

(ii) домен VL содержит последовательности CDR LCDR3, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 8; LCDR2, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 9; LCDR1, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 7.

Также в настоящем документе предложены антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 4; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 4; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 97% идентичности с SEQ ID NO: 4; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с SEQ ID NO: 4; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 4; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 97% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где;



- (i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; и
- (ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где;

- (i) домен VH состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4; и
- (ii) домен VL состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

**[клон g24F02]**

Далее в настоящем документе предложены антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит последовательности CDR HCDR3, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 2; HCDR2, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 5; HCDR1, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 1; и

(ii) домен VL содержит последовательности CDR LCDR3, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 8; LCDR2, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 9; LCDR1, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 7.

Также в настоящем документе предложены антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 6; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 6; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 97% идентичности с SEQ ID NO: 6; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с SEQ ID NO: 6; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 6; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 97% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где;

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где;

(i) домен VH состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6; и

(ii) домен VL состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

**[клон g23H09]**

Далее в настоящем документе предложены антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит последовательности CDR HCDR3, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 12; HCDR2, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 13; HCDR1, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 11; и

(ii) домен VL содержит последовательности CDR LCDR3, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 8; LCDR2, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 9; LCDR1, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 7.

Также в настоящем документе предложены антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 14; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 14; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 97% идентичности с SEQ ID NO: 14; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с SEQ ID NO: 14; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 14; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 97% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где;

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где;

(i) домен VH состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14; и

(ii) домен VL состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

#### **[клон g18C06]**

Далее в настоящем документе предложены антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит последовательности CDR HCDR3, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 16; HCDR2, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 17; HCDR1, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 15; и

(ii) домен VL содержит последовательности CDR L<sub>CDR3</sub>, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 20; L<sub>CDR2</sub>, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 21; L<sub>CDR1</sub>, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 19.

Также в настоящем документе предложены антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 18; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 18; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 97% идентичности с SEQ ID NO: 18; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с SEQ ID NO: 18; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 18; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 97% идентичности с SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:



(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где;

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где;

(i) домен VH состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18; и

(ii) домен VL состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 22.

#### **[клон g20H09]**

Далее в настоящем документе предложены антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит последовательности CDR HCDR3, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 12; HCDR2, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 23; HCDR1, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 11; и

(ii) домен VL содержит последовательности CDR LCDR3, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 8; LCDR2, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 9; LCDR1, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 7.

Также в настоящем документе предложены антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 24; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 24; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 97% идентичности с SEQ ID NO: 24; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с SEQ ID NO: 24; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 24; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 97% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где;

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) где;

(i) домен VH состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24; и

(ii) домен VL состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

Для вариантов осуществления изобретения, в которых домены антител или антигенсвязывающих фрагментов определяются определенной процентной идентичностью последовательности с эталонной последовательностью, домены VH и/или VL могут сохранять последовательности CDR, идентичные последовательностям CDR, присутствующим в эталонной последовательности, так что присутствует вариация. только в рамках регионов. В альтернативном варианте осуществления изобретения последовательности CDR могут также содержать аминокислотные замены (например, консервативные замены, гуманизирующие замены или аффинные варианты) относительно эталонной последовательности.

В изобретении предложены также антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитела к галектину-10, примеры которых представлены в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения примеры антител и антигенсвязывающих фрагментов, определенные как имеющие последовательности CDR, перечисленные выше, или определенные как имеющие определенный процент идентичности с указанными выше конкретными аминокислотными последовательностями домена VH/VL, представляют собой гуманизированные, зародышевые или аффинные варианты антител или их антигенсвязывающие фрагменты, из которых происходят последовательности CDR, VH и/или VL.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения типичные молекулы антител, имеющие указанные выше последовательности CDR, демонстрируют высокую гомологию с человеком, например, представляют собой гуманизированные или

зародышевые варианты антител или их антигенсвязывающих фрагментов, из которых происходят последовательности CDR.

Для молекул антител, предназначенных для терапевтического применения у человека, типично, что вся константная область антитела или по меньшей мере ее часть имеет полностью или практически человеческую аминокислотную последовательность. Следовательно, в одном варианте осуществления область Fc может быть полностью или по существу человеческой в отношении ее аминокислотной последовательности. В контексте константной области гуманизированного или химерного антитела или фрагмента антитела термин «по существу человеческий» относится к идентичности аминокислотной последовательности по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 99% с константной областью человека. Термин «аминокислотная последовательность человека» в этом контексте относится к аминокислотной последовательности, которая кодируется геном иммуноглобулина человека, который включает гены зародышевой линии, реаранжированные и соматически мутированные гены. Изобретение также рассматривает полипептиды, содержащие константные домены «человеческой» последовательности, которые были изменены путем добавления, делеции или замены одной или нескольких аминокислот по отношению к человеческой последовательности, за исключением тех вариантов реализации, в которых присутствует «полностью человеческая» шарнирная область. является явно обязательным. Любая из типичных модификаций области Fc, описанных в настоящем документе, может быть включена в антитела, имеющие последовательности домена CDR и/или VH/VL, перечисленные выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, имеющие последовательности домена CDR и/или VH/VL, перечисленные выше, содержат модифицированный Fc-домен IgG человека, содержащий или состоящий из аминокислотных замен H433K и N434F, причем нумерация домена Fc соответствует нумерации EU. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, имеющие последовательности домена CDR и/или VH/VL, перечисленные выше, содержат модифицированный домен Fc человеческого IgG, содержащий или состоящий из аминокислотных замен M252Y, S254T, T256E, H433K и N434F.

#### **D. Полинуклеотиды, кодирующие антитела, которые связываются с галектином-10**

В изобретении также предложены полинуклеотидные молекулы, кодирующие антитела к галектину-10 по изобретению или их фрагменты. Предложены полинуклеотидные молекулы, кодирующие полноразмерные антитела к галектину-10, вместе с полинуклеотидными молекулами, кодирующими фрагменты, например, домены VH и/или VL антител к галектину-10, описанных в настоящем документе. Также предложены векторы экспрессии, содержащие указанные нуклеотидные последовательности по изобретению, функционально связанные с регуляторными последовательностями, которые обеспечивают экспрессию антител или их фрагментов в

клетке-хозяине или бесклеточной системе экспрессии, и клетке-хозяине или бесклеточной системе экспрессии, содержащей этот вектор экспрессии.

Полинуклеотидные молекулы, кодирующие антитела к галектину-10 по настоящему изобретению, включают, например, молекулы рекомбинантной ДНК. Термины «нуклеиновая кислота», «полинуклеотид» или «молекула полинуклеотида» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к любой молекуле ДНК или РНК, как одноцепочечной, так и двухцепочечной, и, если одноцепочечная, к молекуле с комплементарной ей последовательностью. При обсуждении молекул нуклеиновой кислоты последовательность или структура конкретной молекулы нуклеиновой кислоты может быть описана здесь в соответствии с обычным соглашением о предоставлении последовательности в направлении от 5' к 3'. В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды являются «выделенными». Этот термин, когда он применяется к молекуле нуклеиновой кислоты, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая отделена от последовательностей, с которыми она непосредственно соприкасается в естественно встречающемся геноме организма, из которого она возникла. Например, «выделенная нуклеиновая кислота» может содержать молекулу ДНК, встроенную в вектор, такой как плазмидный или вирусный вектор, или интегрированную в геномную ДНК прокариотической или эукариотической клетки или организма-хозяина, отличного от человека. Применительно к РНК термин «выделенный полинуклеотид» относится прежде всего к молекуле РНК, кодируемой выделенной молекулой ДНК, как определено выше. Альтернативно, этот термин может относиться к молекуле РНК, которая была очищена/отделена от других нуклеиновых кислот, с которыми она могла бы быть связана в ее естественном состоянии (то есть в клетках или тканях). Выделенный полинуклеотид (либо ДНК, либо РНК) может дополнительно представлять собой молекулу, полученную непосредственно биологическими или синтетическими способами и отделенную от других компонентов, присутствующих во время ее получения.

Для рекомбинантного получения антитела к галектину-10 согласно изобретению можно получить рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий его, или рекомбинантные полинуклеотиды, кодирующие различные цепи или домены (с использованием стандартных методов молекулярной биологии) и встроить в реплицируемый вектор для экспрессии в выбранной клетке-хозяине или бесклеточной системе экспрессии. Подходящими клетками-хозяевами могут быть прокариотные, дрожжевые или высшие эукариотные клетки, особенно клетки млекопитающих. Примерами полезных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почек обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия эмбриональных почек человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)); клетки почек детенышей хомячка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки миеломы мыши SP2/0-AG14 (ATCC CRL 1581; ATCC CRL 8287) или NS0 (коллекция культу HPA №

85110503); клетки почек обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почек африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени буйволиной крысы (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI клетки (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); MRC 5 клетки; FS4 клетки; и линия гепатомы человек (Hep G2), а также линия клеток DSM PERC-6 клетка. Векторы экспрессии, подходящие для использования в каждой из этих клеток-хозяев, также широко известны в данной области.

Следует отметить, что термин «клетка-хозяин» обычно относится к культивируемой клеточной линии. Целые человеческие существа, в которых был введен вектор экспрессии, кодирующий антигенсвязывающий полипептид согласно изобретению, явно исключены из определения «клетки-хозяина».

### **Е. Получение антител**

В следующем аспекте в изобретении также предложен способ получения антител по изобретению, который включает культивирование клетки-хозяина (или бесклеточной системы экспрессии), содержащей полинуклеотид (например, вектор экспрессии), кодирующий антитело, в условиях, которые позволяют экспрессировать антитело, и выделение экспрессированного антитела. Этот процесс рекомбинантной экспрессии можно использовать для крупномасштабного производства антител, включая антитела к галектину-10 по изобретению, включая моноклональные антитела, предназначенные для терапевтического применения у человека. Подходящие векторы, клеточные линии и способы производства для крупномасштабного производства рекомбинантных антител, подходящих для терапевтического применения *in vivo*, обычно доступны в данной области техники и хорошо известны специалисту.

### **Г. Фармацевтические композиции**

Изобретение включает фармацевтические композиции, содержащие одно или комбинацию антител к галектину-10 или их антигенсвязывающих фрагментов, составленных с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями или эксципиентами. Такие композиции могут включать одно или комбинацию (то есть два или более разных) антитела к галектину-10. Методики составления моноклональных антител для терапевтического применения у человека хорошо известны в данной области и рассмотрены, например, в работе Wang et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol.96, pp1-26, 2007, содержание которой включено в настоящий документ в полном объеме.

Фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить отдельно или в сочетании с другими видами лечения одновременно или последовательно.

Фармацевтически приемлемые эксципиенты, которые можно использовать для составления композиций, включают, помимо прочего: ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат

калия, частично глицеридные смеси насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как сульфат протамина, гидрофосфат динатрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлозу натрия), полиэтиленгликоль, полиакрилаты, воски, полиэтилен-полиоксипропиленовые блок-полимеры, полиэтиленгликоль и шерстяной жир.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции составлены для введения субъекту любым подходящим путем введения, включая, помимо прочего, внутримышечную, внутривенную, внутрикожную, внутривнутрибрюшинную инъекцию, подкожную, эпидуральную, назальную, пероральную, ректальную, местную, ингаляционную, буккальную (например, сублингвально) и трансдермальное введение.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения путь введения является ингаляционным. Соответственно, композиции по изобретению могут быть составлены в виде порошка для ингаляции или в виде аэрозольной жидкости для ингаляции. Соответственно, композиции согласно изобретению могут быть составлены в виде сухого порошка. Альтернативно, композиции согласно изобретению могут быть составлены в виде распыляемого жидкого аэрозоля или жидкого спрея.

Средства и устройства для ингаляционного введения композиций хорошо известны в данной области техники. Ингаляционное введение композиции может быть осуществлено, например, с помощью распылителя. Небулайзер - это устройство для доставки лекарств, которое используется для введения лекарств в виде тумана, который вдыхается в легкие. Альтернативно для введения композиций по изобретению можно использовать ингалятор. Ингалятор - это устройство для доставки лекарств, которое доставляет лекарства в легкие путем ингаляции. В данной области техники хорошо известны несколько типов ингаляторов, включая, например, дозированные ингаляторы (MDI), ингаляторы с сухим порошком (DPI) и ингаляторы с мягким туманом (SMI).

### **С. Способы лечения**

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с галектином-10, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в способах лечения. Таким образом, в изобретении предложены антитело и антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10 для применения в качестве лекарственного препарата. Альтернативно, в настоящем документе предложены антитело и антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10 для применения в способах лечения. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, предназначенные для применения в качестве лекарственных препаратов, обычно составляют в виде фармацевтических композиций.

Важно отметить, что все варианты осуществления изобретения, описанные выше в отношении антител и антигенсвязывающих фрагментов, в равной степени применимы к способам, описанным в настоящем документе.



В настоящем изобретении предложены также способы лечения субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанных в других местах настоящего документа. В таких способах лечения антитела и антигенсвязывающие фрагменты обычно составляют в виде фармацевтических композиций. Как используется в настоящем документе, термин «терапевтически эффективное количество» предназначен для обозначения количества или дозы антитела к галектину-10, достаточного для оказания терапевтического эффекта, например, количества или дозы антагониста, необходимых для устранения или по меньшей мере облегчения симптомов, связанных с заболеванием или состоянием. Соответствующие количество или доза могут быть определены врачом по мере необходимости. Например, доза может быть скорректирована на основе таких факторов, как размер или вес субъекта, подлежащего лечению, возраст субъекта, подлежащего лечению, общее физическое состояние субъекта, подлежащего лечению, состояние, подлежащее лечению, и путь введения.

Для клинического применения в некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к галектину-10 или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, вводят субъекту в виде одной или более доз от около 0,1 мг/кг массы тела до около 20 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в других местах настоящего документа, вводят субъекту в дозе от около 0,1 мг/кг массы тела до около 10 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в других местах настоящего документа, вводят субъекту в дозе от около 0,5 мг/кг массы тела до около 10 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в других местах настоящего документа, вводят субъекту в дозе от около 1 мг/кг массы тела до около 10 мг/кг массы тела.

Антитела и фрагменты, которые связывают галектин-10, полезны в терапевтических методах по той причине, что они могут нарушать кристаллизацию галектина-10. Как объяснено в других местах настоящего документа, антитела по настоящему изобретению связываются с эпитопом галектина-10, тем самым нарушая кристаллизацию галектина-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела и антигенсвязывающие фрагменты ингибируют кристаллизацию галектина-10. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела и антигенсвязывающие фрагменты способствуют растворению кристаллического галектина-10.

Антитела к галектину-10 и их антигенсвязывающие фрагменты могут использоваться для предотвращения или лечения заболеваний или состояний, связанных с присутствием или образованием кристаллов галектина-10 или CLC. В настоящем документе предложены способы предотвращения или лечения заболевания или состояния, связанного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10 или CLC у пациента

или субъекта, нуждающегося в этом, путем введения эффективного количества антитела к галектину-10 или его антигенсвязывающего фрагмента.

Как используется в настоящем документе, способ «предотвращения» заболевания или состояния означает предотвращение возникновения заболевания, предотвращение ухудшения симптомов, предотвращение прогрессирования заболевания или состояния или снижение риска развития у субъекта заболевания или состояния. Как используется в настоящем документе, способ «лечения» заболевания или состояния означает лечение заболевания или состояния и/или облегчение или устранение симптомов, связанных с заболеванием или состоянием, так что страдания пациента уменьшаются.

Для пациентов, имеющих заболевания или состояния, характеризующиеся наличием кристаллов галектина-10, способы лечения обычно включают введение антитела к галектину-10 или его антигенсвязывающего фрагмента, способного растворять кристаллы галектина-10, находящиеся в тканях пациента. Для пациентов, находящихся в группе риска развития заболевания или состояния, характеризующегося образованием кристаллов галектина-10, методы профилактики могут включать введение антитела к галектину-10 или его антигенсвязывающего фрагмента, способного ингибировать кристаллизацию галектина-10.

Кристаллы галектина-10 или CLC наблюдались у пациентов с рядом заболеваний и состояний. Отсюда следует, что описанные в настоящем документе могут быть использованы для предотвращения или лечения заболевания или состояния, выбранного из группы, включающей: астму, хронический риносинусит, целиакию, гельминтную инфекцию, желудочно-кишечное эозинофильное воспаление, муковисцидоз (CF), аллергический бронхолегочный аспергиллез (ABPA), васкулит Черджа-Строса, хроническую эозинофильную пневмонию и острый миелолейкоз (AML). В предпочтительных вариантах осуществления изобретения антитела к галектину-10 или антигенсвязывающие фрагменты thereof используются для предотвращения или лечения заболевания или состояния, выбранного из группы, включающей: астму, хронический риносинусит, целиакию, гельминтную инфекцию, желудочно-кишечное эозинофильное воспаление, муковисцидоз (CF), аллергический бронхолегочный аспергиллез (ABPA), васкулит Черджа-Строса, хроническую эозинофильную пневмонию и острый миелолейкоз (AML).

Как отмечалось выше, кристаллы галектина-10 или CLC особенно связаны с заболеваниями или состояниями, характеризующимися эозинофильным воспалением. Поэтому в предпочтительных вариантах реализации антитела к галектину-10 или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, используются для лечения нарушений или состояний, связанных с эозинофильным воспалением.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления изобретения антитела к галектину-10 или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, используются для профилактики или лечения астмы. Анализ дыхательных путей и легких пациентов с астмой показал наличие CLC (Persson EK, Verstraete K, Heyndrickx I, et al.

Protein crystallization promotes type 2 immunity and is reversible by antibody treatment. *Science*. 2019;364(6442)). Следовательно, антитела по настоящему изобретению связываются с эпитопом галектина-10 и тем самым нарушают кристаллизацию галектина-10. Это, в свою очередь, предотвращает образование CLC в дыхательных путях и легких больных астмой.

Клинически астма характеризуется обратимой обструкцией дыхательных путей и гиперреактивностью, приводящей к одышке и хрипам. Хотя часто поддается лечению ингаляционными стероидами и бронхолитиками, у подгруппы пациентов наблюдается тяжелое резистентное к терапии заболевание, требующее частых госпитализаций, что может привести к смертельному приступу (Braido F. Failure in asthma control: reasons and consequences. *Scientifica (Cairo)* 2013;2013:549252). Патологически заболевание характеризуется эозинофилией дыхательных путей и чрезмерным производством сгущенной слизи, что может привести к необратимой обструкции мелких дыхательных путей (Zhang L, He L, Gong J, Liu C. Risk Factors Associated with Irreversible Airway Obstruction in Asthma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:9868704). В большинстве случаев заболевание обусловлено иммунным ответом иммунных клеток 2-го типа (лимфоциты CD4 Th2 и врожденные лимфоидные клетки 2-го типа (ILC2)), что приводит к выработке IL-4 (стимулирующего метаплазию бокаловидных клеток и синтез IgE), IL-5 (стимулирующего метаплазию бокаловидных клеток и синтез IgE, тканевая эозинофилия) и IL-13 (вызывающий гиперреактивность бронхов и метаплазию бокаловидных клеток) (Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol*. 2015;16(1):45-56).

В некоторых вариантах осуществления изобретения астма характеризуется как аллергическая астма. Аллергическая астма представляет собой хроническое воспалительное заболевание проводящих дыхательных путей, поражающее 8-12% жителей Европы (Selroos O, Kupczyk M, Kuna P, et al. National and regional asthma programmes in Europe. *Eur Respir Rev*. 2015;24(137):474-483).

В других особенно предпочтительных вариантах осуществления изобретения антитела к галектину-10 или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, используются для предотвращения или лечения муковисцидоза (CF).

Настоящее изобретение относится также к применению антител к галектину-10 или антигенсвязывающие фрагменты их антигенсвязывающих фрагментов для обнаружения галектина-10 в образце, полученном от пациента. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты обычно используются для обнаружения кристаллического галектина-10. Как отмечалось выше, кристаллы галектина-10 или кристаллы CLC наблюдались у пациентов, страдающих рядом различных заболеваний и состояний. Из этого следует, что образец пациента может быть взят от субъекта, имеющего или подозреваемого в наличии любого из следующих заболеваний или состояний: астма, хронический риносинусит, целиакия, гельминтная инфекция, желудочно-кишечное эозинофильное воспаление, муковисцидоз (CF), аллергический бронхолегочный аспергиллез (АВРА), васкулит Черджа-Строса, хроническая эозинофильная пневмония или острый миелолейкоз (AML). Обнаружение

кристаллического галектина-10 в образце пациента можно использовать для диагностики заболевания или состояния у субъекта, от которого был получен образец. Образец может представлять собой любой подходящий образец пациента, например, любую жидкость или ткань, в которых наблюдаются CLC в болезненном состоянии. В некоторых вариантах осуществления изобретения образец представляет собой образец ткани, полученный из полипа, например, полипа носа. В некоторых вариантах осуществления изобретения образец представляет собой образец слизи. В таких вариантах осуществления изобретения обнаружение кристаллического галектина-10 в образце слизи с использованием антител или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению можно использовать для обнаружения или диагностики хронического риносинусита. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения образец пациента представляет собой образец мокроты. В таких вариантах осуществления изобретения обнаружение кристаллического галектина-10 в образце мокроты с использованием антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению можно использовать для обнаружения или диагностики астмы.

### **Н. Наборы**

Любое из антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, может быть упаковано в виде набора и необязательно включать инструкции по применению.

### **ПРИМЕРЫ**

Изобретение будет дополнительно понято со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

### **Предпосылки изобретения и решаемые им задачи**

Было обнаружено, что этот клон связывает и растворяет рекомбинантные кристаллы Шарко-Лейдена ((CLC), также называемые кристаллами галектина-10 (GAL10)). Процесс зародышевого типа посредством прививки области, определяющей комплементарность (CDR), не оказал влияния на связывание и эффективность клона. Однако исследования стабильности выявили сайт дезамидирования (N53G54) в CDR2 тяжелой цепи, что вызывало снижение связывания и активности при температурах инкубации 25°C и 37°C. Чтобы решить эту проблему, были созданы варианты клона с зародышевой линией 7B07 (g7B07) с точечными мутациями N53 и G54 в CDR2 тяжелой цепи. Хотя способность этих мутантов g7B07 растворять рекомбинантные CLC сохранялась, все мутации приводили к снижению свойств связывания.

Следовательно, были инициированы три исследования для выявления дополнительных соединений анти-галектина-10 (анти-Gal10) с более благоприятными свойствами по сравнению с клоном 7B07.

### **Пример 1. Отбор рекомбинантных антител, связывающихся с Gal10**

#### **1.1 Эксперимент с эпитопом 7B07**

Отбор клонов, связывающихся с эпитопом 7B07 на Gal10 посредством фагового дисплея

Для отбора клонов scFv с соответствующей способностью связывания с Gal10 человека использовали метод фагового пэннинга. Для отбора клонов, связывающихся с регионом Gal10, аналогичным клону 7B07, использовали конкурентную установку.

В этой установке клон 1D11, специфичный против человека, нацеленный на остаток тирозина 69, наносили на планшет Maxisorp для захвата Gal10-His. Захват Gal10 с помощью 1D11 имел два преимущества при отборе клонов, связывающихся с эпитопом 7B07. Первое преимущество заключалось в том, что, поскольку 1D11 связывается с сайтом Gal10, противоположным 7B07, эпитоп 7B07 был доступен для фагов, экспрессирующих scFv против Gal10. Вторым преимуществом было то, что при захвате Gal10-His с помощью клона, связывающегося с тирозином 69 (клон 1D11), этот эпитоп был замаскирован. Это актуально, поскольку в ходе отборов выяснилось, что большинство клонов связываются близко к эпитопу 1D11. Элюирование связанных фагов осуществляли либо трипсином (неспецифическое элюирование), либо посредством конкурентного элюирования высокой концентрацией IgG 7B07 (специфическое элюирование фага, экспрессирующего scFv, связывающегося с областью связывания, аналогичной клону 7B07).

Две библиотеки scFv, полученные от ламы (Lambda и Карра), использовали для отбора клонов scFv, обладающих связывающей активностью в отношении Gal10. Два раунда селекции привели к явному обогащению фагов, экспрессирующих scFv, специфичный для Gal10 человека. Наблюдалось такое же обогащение (до 100 раз) по сравнению с контролем PBS.

#### Скрининг специфических связующих Gal10

Два мастер-планшета были созданы после второго раунда селекции против эпитопа 7B07 Gal10, где использовались как трипсин, так и конкурентное элюирование с помощью 7B07. Мастер-планшет 18 (MP18) был получен во втором раунде отбора библиотеки Lambda, где конкурентное элюирование проводилось с первого раунда. Мастер-планшет 19 (MP19) был получен из всех других условий, в которых элюирование проводилось с использованием трипсина или 7B07 (Таблица 3). Из этих мастер-планшетов получали периплазматические экстракты (scFv) и их способность связывания с Gal10 анализировали с помощью ELISA и Viacore.

Номер планшета	Лама	Библиотека	Раунд отбора	Раунд 1 элюирование используемых фагов	Элюирование	
MP18	Ynigo	λ	2	Конкурентное	Конкурентное (7B07)	YLC
MP19	Montoyo	λ и κ	2	Трипсин	Трипсин	ML+МК
	Ynigo	λ и κ	2	Трипсин	Трипсин	YL+YK
	Montoyo	λ и κ	2	Конкурентное	Конкурентное (7B07)	MLC+MKC
	Ynigo	κ	2	Конкурентное	Конкурентное (7B07)	YKC
	Montoyo	λ и κ	2	Трипсин	Конкурентное (7B07)	MLT+MKT
	Ynigo	λ и κ	2	Трипсин	Конкурентное (7B07)	YLT+YKT

Таблица 3: Обзор мастер-планшетов (MP), созданных после цикла отбора эпитопа 7B07 на Gal10.

### Скрининг периплазматических экстрактов scFv

Связывающую способность периплазматических экстрактов анализировали с помощью ELISA (связывание и конкуренция с 7B07) и поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

### Скрининг связывания методом ELISA

Способность связывания scFv (периплазматического экстракта) с Gal10 человека анализировали с помощью ELISA. В этом эксперименте клоны с OD 0,3 или выше были классифицированы как связывающие Gal10. Всего было идентифицировано 48 клонов, специфичных для Gal10.

### Конкурентный скрининг методом ELISA

Область связывания с мишенью scFv на Gal10 затем анализировали с помощью дополнительного ELISA, в котором исследовали конкуренцию клонов против клона 7B07. В этой установке Gal10 был захвачен на пластине Maxisorp, покрытой 7B07. Поэтому ожидалось, что клоны с положением связывания, аналогичным клону 7B07 на Gal10, не смогут связываться и будут демонстрировать низкое значение OD, тогда как клоны, связывающиеся с другими областями, будут демонстрировать высокое значение OD.

Анализ экспериментов по связыванию и конкурентному ELISA показал, что 25 клонов конкурировали с клоном 7B07 за связывание Gal10. Эти клоны показали значение OD >0,3 в связывающем ELISA и значение OD <0,1 в конкурентном ELISA.

### Скрининг скорости диссоциации на SPR (Biacore 3000)

Скорость диссоциации оставшихся 25 клонов эксперимента ELISA определяли методом SPR на приборе Biacore 3000. Периплазматические экстракты вводили на сенсорный чип CM5, покрытый 2500 RU Gal10-His. Одиннадцать клонов продемонстрировали по меньшей мере двукратное улучшение скорости диссоциации по сравнению с клоном 7B07 ( $2,18E-03$  1/с), и эти клоны были отобраны для дальнейшей характеристики (таблица 4).

<b>Клон</b>	<b>Скорость диссоциации (kd (1/с))</b>	<b>Кратность скорости диссоциации по сравнению с g7B07</b>	<b>Rmax</b>
18C06	4,81E-04	0,22	1860
18H12	8,58E-04	0,39	222
18E04	9,61E-04	0,44	1170
18E05	9,63E-04	0,44	1570
18G07	9,63E-04	0,44	1690
18D09	1,19E-03	0,55	1010
19A04	2,27E-03	1,04	872
18G12	2,44E-03	1,12	938
19C10	3,32E-03	1,52	486

18G08	3,49E-03	1,60	243
18E01	4,37E-03	2,00	967
7B07 (среднее)	2,18E-03	1,00	574

Таблица 4: Скорости диссоциации периплазматических экстрактов scFv. В этой таблице указаны амплитуда связывания ( $R_{max}$ ), диссоциация (скорость диссоциации) каждого клона, а также кратное изменение скорости диссоциации по сравнению с контролем (g7B07).

### **1.2 Проведение перетасовки тяжелых цепей**

Был применен подход перетасовки тяжелой цепи, чтобы найти клоны, которые спариваются с легкой цепью 7B07 и обеспечивают хорошее средство к Gal10 и улучшенную стабильность.

#### **Строительство библиотеки (VN перетасовка Fab)**

Для создания перетасованных библиотек тяжелых цепей использовали двухэтапную PCR. Во-первых, немеченые праймеры были использованы непосредственно на кДНК двух иммунизированных лам (полученных в ходе предыдущего отбора) для амплификации VH CH1. Полученный PCR-продукт затем очищали и использовали во второй PCR с мечеными праймерами для амплификации VH. Поскольку клон 7B07 был выделен из лампы Montoyo, VL клона 7B07 был перетасован с репертуаром VH, амплифицированным с помощью PCR, из лампы Montoyo. Конечный размер библиотеки Fab составлял  $1,5E+07$  комбинаций VH/VL, при этом процент правильной вставки VL и VH составлял 94%, как определялось с помощью PCR колоний.

Для отбора новых Fab со сравнимой или лучшей способностью связывания с Gal10 человека, чем родительский Fab g7B07, использовали подход фагового пэннинга. С этой целью первый и второй этапы отбора были проведены на человеческом Gal10-His и неродственном белке, меченном His (в качестве контроля). Третий и четвертый раунды отбора были проведены на растворимом, не меченном His человеческом Gal10.

Первые два раунда селекции проводили на 1 и 10 мкг/мл покрытого человеческого Gal10-His и 10 мкг/мл несвязанного белка, меченного His. И для первого, и для второго раунда отбора элюированные фаги из условия 10 мкг/мл Gal10-His использовали для последующих третьего и четвертого раундов отбора.

#### **Скрининг специфических связующих Gal10**

##### **Получение Fab в виде периплазматических экстрактов**

Из элюированных трипсином фагов раунда 3 и раунда 4 были получены одиночные клоны, что привело к созданию двух мастер-планшетов (таблица 5). Мастер-планшет 24 (MP24) был создан в результате третьего раунда селекции с колониями, отобранными из разных условий (Gal10, промывка без нормы и промывка без нормы). Мастер-планшет 26 (MP26) был создан в результате четвертого раунда селекции с колониями, отобранными как из ненормированной, так и из ненормированной промывки.



Номер планшета	Лама	Библиотека	Раунд отбора	Элюирование	Выбран для Gal10 в концентрации (мкг/мл)
MP24	Montoyo	λ	3	Трипсин	25% 5 мкг/мл NORW 25% 0,5 мкг/мл NORW 50% 5 мкг/мл ON ORW
MP26	Montoyo	λ	4	Трипсин	100% 0,5 мкг/мл NORW

Таблица 5: Обзор мастер-планшетов, полученных после отбора против человеческого Gal10.

#### Анализ последовательности

Результаты секвенирования мастер-планшета 24 (MP24) показали, что на основе последовательностей CDR3 присутствовали только 4 группы семейств VH, отличных от 7B07\_VH. Дальнейший анализ показал, что 2 из этих 4 семейств VH представляли собой однодоменные антитела верблюдовых. Из двух оставшихся семейств VH для дальнейшего анализа был выбран репрезентативный клон - клон 24A04 и клон 24F02.

#### Связывание Gal10 двух выбранных клонов с использованием технологии BLI

Периплазматические экстракты из двух выбранных клонов тестировали на связывание с захваченным Gal10-His с использованием прибора Octet RED96 (технология биослойной интерферометрии (BLI)).

В этот анализ в качестве эталона был включен зародышевый клон клона 7B07 (g7B07). Был измерен низкий ответ на Gal10-His по сравнению с эталонным клоном. Только клон 24F02 показал лучшую (в 128 раз) скорость диссоциации по сравнению с клоном g7B07 (таблица 6).

Клон	Ответ (нм)	kd (1/с)	Кратная разница kd по сравнению с эталоном
g7B07	0,72	7,54E-03	1,0
24F02	0,19	5,86E-05	128,7
24A04	0,09	5,60E-02	0,1

Таблица 6: Рассчитанные скорости диссоциации kd (1/с).

#### Конкурентное ELISA к эпитопу 7B07

Был проведен конкурентный ELISA, чтобы убедиться, что выбранные клоны нацелены на тот же участок Gal10, что и клон g7B07. Вкратце, 96-луночный планшет

Maxisorp покрывали 7B07\_hIgG1 и захватывали Gal10-His. Затем инкубировали периплазматические экстракты, содержащие Fab Мус, и связанный Fab обнаруживали с помощью анти-Мус-HRP антитела. Клоны, имеющие значение OD <0,1, определяли как имеющие общий эпитоп 7B07. Образец положительного контроля (клон 18C06) использовали в качестве эталонного образца.

Клон 24F02 не обнаружил связывания, что позволяет предположить, что 24F02 связывается с тем же эпитопом, что и клон 7B07. Аналогичные данные были получены для контрольного антитела 18C06, которое, как известно, конкурирует с 7B07. Клон 24A04, напротив, показал значение OD >0,1, что указывает на то, что он связывается с другим эпитопом, чем 7B07.

Клон	Среднее значение OD
18C06	0,030
24A04	0,289
24F02	0,010

Таблица 7: Средние значения OD 450нм.

### **1.3 Проведение рандомизации 7B07 CDR2 VH**

#### **Создание библиотеки (Fab)**

Рандомизация сайта дезамидирования в CDR2 g7B07 - N53G54 - не позволила получить вариант g7B07 без сайта дезамидирования и с хорошей аффинностью связывания с Gal10. Остатки CDR2 были рандомизированы для поиска последовательностей без сайта дезамидирования и хорошей аффинности связывания. Структурное моделирование части 7B07 Fab в комплексе с Gal10 позволило создать рандомизированные библиотеки CDR2 для дальнейшего исследования. Только гибкий кончик петли CDR2 (остатки 52-57 - KNGGGI) (SEQ ID NO: 74) был рандомизирован, а антипараллельный бета-лист остался нетронутым; были сконструированы четыре библиотеки. В библиотеке, помеченной X6, все 6 остатков гибкого кончика петли CDR2 были рандомизированы (IXXXXXXX, где X представляет одну рандомизированную аминокислоту). Поскольку это сопряжено с риском обнаружения исходной последовательности CDR2 7B07 VH, были созданы 3 дополнительные библиотеки, которые были на 1 аминокислоту короче: X3 (IKXXXIT) (SEQ ID NO: 75); X4 (IXXXXT); и X5 (IXXXXXT); в которых «X» представляет собой рандомизированное положение.

В кристаллической структуре остатки 54-56(GGG) сталкиваются с молекулой Gal10 и отгибают G55. Поэтому считалось, что сокращение последовательности на 1 аминокислоту может лучше подходить для связывания Gal10.

Для рандомизации шести остатков в CDR2 переменного домена тяжелой цепи клона g7B07 для каждой библиотеки был создан определенный набор праймеров. После двух стадий гнездовой PCR с использованием ДНК тяжелой цепи клона зародышевой линии 7B07 в качестве матрицы ампликоны расщеплялись ферментами рестрикции перед

лигированием в фагмидный вектор РСВ13, содержащий вариабельный домен легкой цепи g7B07.

В результате строительства библиотеки были созданы четыре библиотеки, размер которых в 5 1224 раза превышал теоретический размер библиотеки (таблица 8).

	X3	X4	X5	X6
Размер библиотеки (включая % вставки)	1,13E+07	4,50E+06	1,70E+07	7,05E+08
Количество рандомизированных остатков	3 остатка	4 остатка	5 остатков	6 остатков
Теоретический размер библиотеки	9,3E+03	1,9E+05	4,1E+06	8,6E+07
Сгиб по сравнению с размером библиотеки	1224	23	5	8

Таблица 8: Размер четырех разных созданных библиотек.

#### Выбор с помощью фагового дисплея

Для идентификации стабильных вариантов g7B07 с хорошей аффинностью связывания с Gal10 фагам четырех различных библиотек (входные) давали возможность связываться с Gal10-His, нанесенным на планшет Maxisorp, в присутствии или в отсутствие нестандартных промывок с 10-кратным избытком Gal10-His в течение 24 часов. Для оценки специфического обогащения в отношении Gal10, а не His-метки, в качестве отрицательного контроля наносили несвязанный His-меченный белок. Этот процесс приводил к явному обогащению после первого раунда отбора. Выходные титры пэннинга неродственного белка, меченного His, были явно выше, чем в контроле PBS. Кроме того, 24-часовая промывка с пониженной скоростью, выполненная с 10-кратным избытком Gal10, привела к более низкому обогащению (в 10-100 раз) по сравнению с элюированием, выполненным на 0-й день, но аналогично контрольному элюированию, выполненному через 24 часа (данные не показаны), с наиболее вероятным фагом, экспрессирующим Fab с более высоким сродством к человеческому Gal10.

Элюированные фаги из условия 10 мкг/мл в раунде 1 прямого элюирования трипсином дополнительно отбирались по двум концентрациям покрытого Gal10-His (10 и 1 мкг/мл). В том же процессе во время второго раунда отбора применялась промывка со скоростью диссоциации.

Результат второго раунда отбора показал такое же или почти в 10 раз меньшее обогащение по сравнению с первым раундом. 24-часовая промывка со скоростью диссоциации приводила к 10-кратному снижению выходного титра по сравнению с состоянием без промывки со скоростью диссоциации, за исключением случая библиотеки

X3. Для каждой библиотеки готовили по одному эталонному планшету, включая клоны из первого и второго раундов селекции с отбором по норме и без него.

Скрининговое связывание рандомизированных клонов CDR2

Получение периплазматических экстрактов Fab

Из элюированных фагов первого и второго раундов селекции (с промывкой или без нее) были созданы отдельные клоны, что приводило к созданию в общей сложности четырех мастер-планшетов (по одному мастер-планшету на библиотеку, с колониями, отобранными из разных условиях, как показано в таблице 9).

Номер планшета	Библиотека	Раунд отбора	Элюирование	Выбрано для Gal10 в концентрации (мкг/мл)	Промывка со скоростью диссоциации (10-кратный избыток Gal10-His)
MP20	X3	1-2	Трипсин	10	24 ч
MP21	X4	1-2	Трипсин	10	24 ч
MP22	X5	1-2	Трипсин	10	24 ч
MP23	X6	1-2	Трипсин	10	24 ч

Таблица 9: Обзорная таблица эталонного планшета (МП), полученная после кампании селекции против Gal10-His человека (проведение рандомизации CDR2).

Всего было создано четыре мастер-планшета после первого и второго раундов селекции против 10 мкг/мл человеческого Gal10 с промывкой или без промывки, выполненной с 10-кратным избытком антигена, методом элюирования трипсином.

Из этих мастер-планшетов были получены периплазматические экстракты (Fab) и их способность связывания с Gal10 человека анализировалась методом SPR.

Скрининг периплазматических экстрактов Fab, полученных в ходе проведения рандомизации CDR2

Свойства связывания Fab (периплазматического экстракта) с Gal10-His человека анализировали методом SPR с помощью прибора Biacore 3000. Для этого разбавленный периплазматический экстракт наносили на чип CM5, покрытый человеческим Gal10-His. В качестве положительного контроля в начале и конце опыта включали инъекцию 20 нМ очищенного клона g7B07 в основную цепь Fab человека. Во время скрининга можно было определить только диссоциацию (скорость диссоциации) Fab, поскольку эффективная концентрация Fab была неизвестна и может значительно варьироваться от клона к клону.

Среди 376 клонов, прошедших скрининг с помощью SPR, большинство подвергнутых скринингу периплазматических экстрактов показали более высокую скорость диссоциации, чем клон g7B07 (скорость диссоциации=6,9E-03 1/с).

Клон	Библио-тека	kd (1/с)	Кратность скорости диссоциации по сравнению с g7B07	Rmax (RU)	Рандомизированная часть CDR2
<b>g20H09</b>	X3	8,8E-03	<b>1,3</b>	322	<u>IKWHRIT</u> (SEQ ID NO: 38)
g20F04	X3	1,6E-02	2,3	180	<u>IKHQVIT</u> (SEQ ID NO: 39)
g20B05	X3	2,3E-02	3,3	369	<u>IKPVGIT</u> (SEQ ID NO: 40)
g21B01	X4	2,6E-02	3,8	146	<u>ISGALT</u> (SEQ ID NO: 41)
g21F11	X4	3,5E-02	5,1	84,2	<u>IHTPMT</u> (SEQ ID NO: 42)
g21C06	X4	3,6E-02	5,2	61,7	<u>IKRPWT</u> (SEQ ID NO: 43)
g22C03	X5	2,0E-02	2,9	425	<u>IKLGTFT</u> (SEQ ID NO: 44)
<b>g23H09</b>	X6	2,7E-03	<b>0,4</b>	424	<u>IAQFQHWT</u> (SEQ ID NO: 45)
g23E05	X6	1,3E-02	1,8	624	<u>IRTFEHHT</u> (SEQ ID NO: 46)
g23H11	X6	2,5E-02	3,6	373	<u>ISKMPHLT</u> (SEQ ID NO: 47)
g23G11	X6	1,8E-02	2,6	211	<u>IQKTIVPT</u> (SEQ ID NO: 48)
g7B07 (средний)	Контр.	6,9E-03	1,0	717	<u>IKNGGGIT</u> (SEQ ID NO: 49)

Таблица 10: Скрининг периплазматических экстрактов Fab, полученных в ходе кампании рандомизации CDR2 с использованием технологии SPR. Клоны с аналогичной или лучшей степенью отклонения по сравнению с контролем g7B07 выделены жирным шрифтом (столбец «Кратность скорости диссоциации»). Рандомизированная часть последовательности CDR2 подчеркнута.

Связывающую способность периплазматического экстракта Fab анализировали с помощью технологии SPR с использованием Biacore 3000. Кратко, разбавленные периплазматические экстракты инъецировали на чип CM5, покрытый 2500 RU Gal10-His. Указаны амплитуда связывания ( $R_{max}$ ), диссоциация (скорость диссоциации) каждого клона, а также кратность изменения скорости диссоциации по сравнению с контролем (g7B07 и g7B07\_N53A). Клоны g20H09 и g23H09 имели аналогичный или лучший показатель скорости диссоциации по сравнению с контролем g7B07 (таблица 10). Рандомизированная часть последовательности CDR2 подчеркнута (таблица 10).

Ограниченное количество клонов, выделенных из четырех различных библиотек рандомизации CDR2, продемонстрировало соответствующие свойства связывания (Таблица 10). Среди этой панели клон g23H09, выделенный из библиотеки X6, был уникальным клоном, показавшим лучшую скорость диссоциации, чем родительский клон 7B07 (скорость диссоциации в 2,5 раза выше). При скорости диссоциации, равной  $8,8E-03$  1/с, клон 20H09, выделенный из библиотеки X3, показал аналогичную скорость отклонения по сравнению с клоном g7B07. Однако рандомизированная часть CDR2 клонов g20H09 (WHR) и g23H09 (AQFQHW) показала одну возможную опасность, представленную присутствием одного триптофана, который потенциально может окисляться под воздействием света.

Наконец, при скорости диссоциации в 1,8-2,3 раза выше, чем у g7B07, клоны 23E05 (библиотека X6) и 20F04 (библиотека X3) продемонстрировали свойство связывания, близкое к родительскому клону. Ни один из клонов, выделенных из библиотек X4 и X5, не продемонстрировал соответствующих свойств связывания.

#### **Краткое изложение результатов примера 1**

Для дальнейшей характеристики были отобраны семь клонов из примера 1 (таблица 11). Эти клоны были выбраны на основании их связывающей способности (связывание BLI или SPR), характеристики эпитопа (конкурентный ELISA) и последовательностей VH и VL (таблица 11).

Клоны	Действие	Формат периплазматических связующих анти-GAL10	kd, кратность по сравнению с g7B07 (BLI или SPR)	Биннинг эпитопов
g20H09	Рандомизация CDR2 (X3)	Fab	0,8	Не исследовался
g23H09	Рандомизация CDR2 (X6)	Fab	2,5	Не исследовался
18C06	Эпитоп типа 7B07	scFv	14,3	7B07 bin
24F02	Перетасовка тяжелой цепи	Fab	1,6	7B07 bin

18G12	Эпитоп типа 7B07	scFv	2,8	7B07 bin
18G07	Эпитоп типа 7B07	scFv	7,1	7B07 bin
18E04	Эпитоп типа 7B07	scFv	7,2	7B07 bin
7B07	Контроль	Fab	1,0	/

Таблица 11: Характеристики клонов scFv/Fab, выбранных для зародышевой линии и переформатирования в Fab человека

**Пример 2: Зародышевая линия, переформатирование и получения выбранных клонов в основной цепи Fab человека**

Прежде чем семь выбранных клонов были дополнительно охарактеризованы, клоны были гуманизированы и повторно клонированы в остов Fab человека.

Зародышевая линия выбранных клонов с помощью метода прививки CDR

Чтобы снизить иммуногенность выбранных клонов анти-Gal10, зародышевую линию переменных областей (VH и VL) инициировали путем прививки области, определяющей комплементарность (CDR), в ближайший каркас зародышевой линии человека (FW). Была идентифицирована последовательность зародышевой линии человека, обладающая наибольшей идентичностью V-области выбранных клонов.

Вариант 24F02 был дополнительно разработан для удаления потенциального сайта дезамидирования (pos53\_CDR2\_VH), расположенного точно в том же положении, что и g7B07. По этой причине позиция N 53 была мутирована на A.

Поскольку библиотеки рандомизации CDR2 были построены с использованием ДНК переменного домена тяжелой цепи зародышевого варианта 7B07, все созданные клоны (g20H09 и g23H09) уже были гуманизированы.

**Пример 3: : Характеристика связывания клонов с зародышевой линией в основной цепи Fab человека**

Характеристика свойств связывания выбранных клонов Fab из трех кампаний по обнаружению SPR.

Свойства связывания выбранных клонов Fab с Gal10 человека анализировали с помощью метода захвата, установленного на приборе Biacore 3000. Две концентрации выбранных клонов Fab исследовали на Gal10-His человека, иммобилизованном на чипе CM5, покрытом моноклональным анти-His. В качестве контроля клоны g7B07 и g7B07\_N53A вводили в начале и в конце опыта. Вкратце, чип CM5 покрывали моноклональным анти-His антителом (4000 RU), затем фиксированную концентрацию человеческого Gal10-His (25 мкг/мл) захватывали на анти-His чипе, затем получали две концентрации клонов в основной цепи Fab человека.

Варианты с зародышевой линией клонов, идентифицированные в таблице 11, показали аналогичную или лучшую степень отклонения и аффинность, чем клон g7B07 (см. таблицу 12). Среди этой панели клоны, выделенные в ходе кампании по эпитопу 7B07, показали наилучшую степень диссоциации: в 6,2-9,8 раз лучшую степень диссоциации, чем клон g7B07.

Зародышевая линия (g24F02) и сконструированная версия (g24F02\_N53A) исходного клона 24F02 продемонстрировали более высокие степени диссоциации по сравнению с исходными степенями диссоциации ( $5,86E-05$  1/с), наблюдаемыми во время более раннего скрининга на BLI. Два Fab показали очень схожую связывающую способность, демонстрируя, что удаление сайта дезамидирования, обнаруженного в положении 53, не влияет на связывающие свойства g24F02, в отличие от g7B07, который показал заметное снижение связывающей способности в сконструированном варианте g7B07\_N53A.

При скорости ассоциации в диапазоне  $7,1-8,3 E+05$ , и скорость диссоциации равной  $1,6E-03$  1/с, и аффинности в диапазоне  $2,0-2,3$  нМ, эти клоны показали ассоциацию  $1,6-1,9$  раза выше, скорость диссоциации в  $2,8$  раза и сродство в  $4,7$  раза выше, чем у клона g7B07.

Наконец, два клона, выделенные в ходе рандомизации CDR2, показали различные свойства связывания, что соответствует данным скрининга. Клон g23H09 показал аналогичную скорость ассоциации, аффинность в  $2,8$  раза большую ( $3,9$  нМ) и скорость диссоциации в  $1,8$  раза выше, чем у клона g7B07. Клон g20H09 продемонстрировал в  $3$  раза более высокую скорость диссоциации, но аналогичную аффинность.

Все клоны показали лучшую аффинность и скорость диссоциации по сравнению со сконструированным вариантом g7B07\_N53A ( $k_d$   $7,8E-02$  1/с,  $KD$   $143,5$  нМ).

<b>Характеристика очищенного Fab (2 концентрации)</b>					
<b>Конструкции</b>	<b>Rmax (RU)</b>	<b>ka (1/мс)</b>	<b>kd (1/с)</b>	<b>KD (нм)</b>	<b>kd-кратность снижения в сравнении с g7B07</b>
g18G12	289	$1,3E+05$	$7,6E-04$	5,7	6,2
g18G07	616	$2,6E+05$	$6,5E-04$	2,5	7,2
g18E04	803	$3,2E+05$	$7,4E-04$	2,3	6,3
g18C06	815	$4,1E+05$	$4,8E-04$	1,2	9,8
g23H09	1037	$6,5E+05$	$2,5E-03$	3,9	1,8
g20H09	797	$8,6E+05$	$1,5E-02$	17,5	0,3
g24F02	745	$8,3E+05$	$1,6E-03$	2,0	2,8
g24F02_N53A	751	$7,1E+05$	$1,6E-03$	2,3	2,8
g7B07 (среднее)	698	$4,2E+05$	$4,7E-03$	11,1	1,0
g7B07_N53A (среднее)	178	$6,4E+05$	$7,8E-02$	143,5	0,06

Таблица 12: Связывающие свойства выбранных клонов зародышевой линии из таблицы 11.

#### **Пример 4: Исследование стабильности выбранных клонов**



Чтобы исследовать проблемы, аналогичные проблеме клона g7B07, где после стресс-тестирования сайт дезамидирования в CDR2 варибельного домена тяжелой цепи вызывал явное снижение связывания и активности, анализировали стабильность выбранных клонов.

С этой целью было проведено исследование температурного стресса. В этой установке подвергнутые стрессу образцы инкубировали в течение двух недель при 37°C, а затем анализировали бок о бок с не подвергшимися стрессу образцами (T0) на связывание, эффективность (растворение CLC) и посттрансляционную модификацию (с акцентом на последовательность CDR2). Исследуемые клоны показали разные стартовые концентрации (3,2-7,3 мг/мл).

#### Анализ связывающей способности образцов, подвергнутых температурному стрессу на SPR

Связывающие свойства семи выбранных клонов после двух недель температурного стресса анализировали с использованием оптимизированного метода захвата на приборе Biacore 3000. Связывающие свойства подвергнутых стрессу образцов определяли по сравнению с точкой калибровки и выражали в процентах относительной активности (% RA).

Вкратце, метод захвата был настроен на приборе Biacore 3000. Для этой цели чип CM5 покрывали моноклональным анти-His антителом (4000 RU), затем фиксированную концентрацию человеческого Gal10-His (25 мкг/мл) захватывали на анти-His чипе перед повторными инъекциями калибраторов, образцов для контроля качества и образцов, подвергшихся температурному стрессу, для каждого клона. Затем с помощью программного обеспечения BIAevaluation рассчитывали наклон каждого введенного образца. Концентрации образцов для контроля качества и образцов, подвергнутых температурному напряжению, были повторно рассчитаны путем интерполяции полученных наклонов этих образцов к кривой калибратора. Полученные значения находились в пределах +/-20% от номинальной концентрации в исследуемых образцах и были выражены как средняя относительная точность (средн. %RA) (таблица 13).

		% относительной активности (RA) на Biacore	
Клоны	Из	T0	T2W
g18C06	Эпитоп типа 7B07	108	106
g18E04	Эпитоп типа 7B07	100	74
g18G07	Эпитоп типа 7B07	101	33
g18G12	Эпитоп типа 7B07	99	95
g20H09	Случайный CDR2 (X3)	110	86
g23H09	Случайный CDR2 (X6)	98	78
g24F02	Перетасовка тяжелой цепи	101	175*
g24F02_N53A	Перетасовка тяжелой цепи	98	99

Таблица 13: Анализ связывающих свойств образцов выбранных клонов, подвергшихся температурному стрессу, выделенных в ходе трех исследований.

Клоны g18G12, g18C06 и g24F02\_N53A показали лучшую стабильность через две недели при 37°C, с такой же связывающей способностью, как и образцы, не подвергшиеся температурному стрессу (95%, 106% и 99% RA, соответственно) (таблица 13). Кроме того, не сконструированный вариант g24F02 не продемонстрировал какой-либо потери связывания после двух недель инкубации при 37°C, демонстрируя, что дезамидирование в положении 53 не влияет на его связывающие свойства.

Клоны g23H09 и g20H09 показали пониженную связывающую способность после инкубации при 37°C, что привело к 78% и 86% RA через две недели соответственно. Однако это снижение связывания на 14% и 22% может быть связано с вариациями анализа.

Температурный стресс образцов, содержащих g18G07 и g18E04, показал явное снижение связывания (33% и 74% RA), что подчеркивает их нестабильность

#### Анализ посттрансляционных модификаций (с фокусировкой на CDR2\_VH)

После двух недель температурного стресса полученные образцы анализировали на посттрансляционную модификацию, которая фокусировалась на CDR2 тяжелой цепи этих клонов.

Большинство исследованных клонов показали относительно низкий процент модификации после двух недель инкубации при 37°C. Клоны g18C06, g20H09 и g23H09 показали наименьшую степень модификации, соответственно, 3,1%, 2,4% и 8,4% модификации в анализируемых последовательностях (таблица 14).

Наряду со снижением активности связывания после инкубации при 37°C клон g18G07 и в меньшей степени клон g18E04 демонстрировали посттрансляционные модификации (таблица 14). Клон g18E04 продемонстрировал модификацию на 11,7% после двух недель инкубации при 37°C, в основном за счет дезамидирования положения 52 Asn, что могло бы объяснить его пониженную связывающую способность (таблицы 13 и 14). Не подвергнутый стрессу образец клона g18G07 показал 20,2% модификации, которая увеличилась до 63% модификации после двух недель инкубации при 37°C, в основном за счет дезамидирования Asn в положении 53 (58,8%), что объясняет потерю связывающая способность образцов, подвергшихся температурному стрессу.

Не подвергнутый стрессу образец клона g18G12 показал 30%-ное дезамидирование (Asn в положении 54), на которое не влияли две недели инкубации при 37°C. Дезамидирование этого клона, скорее всего, произошло в процессе производства (6 дней при 37°C).

		% Относительной величины модификации			
Клоны	Модификация	Модифицированный сайт AA	T0	T2W	Последовательности FW2/CDR2 VH
g18C06	Немодифицированный	/	98,0	96,9	<u>GLEWVSGINSGDGSSVK</u> (SEQ ID NO: 50)
	Дезамидирование	N52	0,7	0,8	
	Диоксидирование	W47	1,3	2,3	
g18E04	Немодифицированный	/	92,3	88,3	<u>GLEWVSAINSGGGTTYADTVK</u> (SEQ ID NO: 51)
	Дезамидирование (IsoAsp)	N52	3,5	7,2	
	Дезамидирование (Asp)	N52	2,0	2,9	
	Сукцинимид	N52	0,3	0,3	
	Диоксидирование	W47	1,9	1,4	
g18G07	Немодифицированный	/	79,8	37,0	<u>GLEWVSSIINGGESTTYRDSVK</u> (SEQ ID NO: 52)
	Дезамидирование (IsoAsp)	N53	10	43,2	
	Дезамидирование (Asp)	N53	3,7	15,6	
	Сукцинимид	N53	2,8	1,7	
	Диоксидирование	W47	1,8	1,1	
	Неизвестный	?	1,9	1,6	
g18G12	Немодифицированный	/	61,5	62,8	<u>GLEWVSSISWNGQNTYYADTGK</u> (SEQ ID NO: 53)
	Дезамидирование (Asp)	N54	29,8	28,9	
	Сукцинимид	N54	8,6	8,4	
g20H09	Немодифицированный	/	98,9	99,3	<u>GLEWVSAIKWHRITYYADSVK</u> (SEQ ID NO: 54)
	Диоксидирование	W47	1,7	1,7	

	Изомеризация	D61	1,1	0,7	
g23H09	Немодифицированный	/	95,8	91,6	<u>GLEWVSAIAQFQHWTTYADSVK</u> (SEQ ID NO: 55)
	Окисление	W57	1,9	3,4	
	Диоксидирование	W47	1,2	1,4	
	Изомеризация	D62	n.d	0,3	
	Неизвестный	Q53 или Q55	1,2	3,1	

Таблица 14: Посттрансляционные модификации (фокус PM CDR2\_VH) образцов температурного стресса выбранных анти-Gal10-клонов. В таблице изображена только часть последовательностей FW2 и CDR2 VH выбранных клонов, поскольку в FW2 наблюдалась посттрансляционная модификация, в основном с W в положении 47. Подчеркнутые остатки представляют собой CDR2 (согласно нумерации Кабата).

Анализ эффективности образца, подвергнутого температурному стрессу, для растворения рекомбинантных CLC

Была исследована способность подвергнутых температурному стрессу образцов выбранных клонов в основной цепи Fab человека растворять рекомбинантные CLC.

Клон 1D11 (специфичный для человека) был включен в качестве эталона для корректировки вариаций между анализами. Растворение CLC контролировали с течением времени с помощью анализатора InCell 2200 после 2, 5, 7 и 16 часов инкубации (фигура 1). Вкратце, антитела тестировали при концентрации 250 мкг/мл (n=4) в двух независимых экспериментах, а изображения получали через 2, 5, 7 и 16 часов после добавления антител. Изображения сегментировали с использованием алгоритма, разработанного для обнаружения отдельных кристаллов и общей площади кристаллов на лунку. В этой установке 1 мкл образцов (T0 и T2W), разбавленных до 1,5 мг/мл, наносили на рекомбинантные CLC, образованные с 1 мкг Gal10.

Диапазон кристаллов (мкм)	Эффективность растворения CLC							
	10-20		5-10		10-20		5-10	
	Опыт 1_2 ч		Опыт 2_2 ч		Опыт 1_5 ч		Опыт 2_5 ч	
Клоны	T0	2W	T0	2W	T0	2W	T0	2W
g18G12	37,9	30,9	82,6	80,5	70,4	66,3	93,5	92,0
g18G07	37,9	18,6	75,6	46,7	61,0	31,7	91,4	72,4
g18E04	30,6	23,3	81,7	75,7	66,5	49,3	93,8	92,1
g18C06	36,6	43,4	81,4	81,4	76,8	78,8	92,1	91,4
g23H09	59,6	52,9	87,9	85,6	84,1	80,6	94,0	90,9
g20H09	68,6	70,0	91,0	86,7	91,4	88,8	93,7	93,6
1D11	20,5	/	62,1	/	36,2	/	85,0	/

Таблица 15: Средний % площади кристаллов, растворенных на лунку, после инкубации с каждым из клонов.

Анализы проводились с CLC, от 5-10 мкм (опыт 2) до 10-20 мкм (опыт 1). Было замечено, что размер кристаллов влияет на эффективность Fab. В частности, CLC размером от 10 до 20 мкм позволял лучше различать клоны.

Клоны g20H09 и g23H09 были наиболее мощными клонами в панели (фигура 1 и таблица 15). Эти клоны были способны растворять 59,6% и 68,6% рекомбинантных CLC в течение 2 часов (опыт 1). Напротив, другие клоны показали растворение от 30,6% до 37,9% через 2 часа (опыт 1). В целом, после 5 часов инкубации большинство клонов (за исключением g18G07 и 1D11) смогли сольубилизовать ~90% CLC.

Положительный контроль, клон 1D11, продемонстрировал самую низкую эффективность растворения кристаллов при растворении CLC 20% и 36% после 2 и 5 часов инкубации соответственно.

В соответствии с другими результатами стабильности (связывание и посттрансляционные модификации), образцы клонов g18C06, g20H09, g23H09 и g18G12, подвергнутые температурному стрессу, показали такую же эффективность, как и образцы без стресса. В соответствии со сниженной связывающей способностью образцов клонов g18G07 и g18E04, подвергшихся температурному стрессу, эти образцы показали пониженную эффективность растворения рекомбинантных CLC.

Способность g24F02\_N53A растворять рекомбинантные CLC анализировали с помощью конфокального микроскопа с вращающимся диском. Вкратце, гуманизированные Fab-фрагменты инкубировали с предварительно полученным CLC и контролировали растворение кристалла с течением времени.

В соответствии с данными связывания, образцы, подвергшиеся температурному стрессу (2 недели при 37°C), показали аналогичную эффективность по сравнению с образцами, не подвергавшимися стрессу (фигура 2 и таблица 16). Это подчеркивает стабильность этого клона в течение двух недель при 37°C. Фактически, исследованные образцы из этого клона показали 50%-ное растворение CLC в течение 43-46 минут (таблица 16). Клон g24F02 показал аналогичную, но немного меньшую активность по сравнению с g7B07 как в не подвергнутых стрессу, так и в температурных образцах.

	<b>Анализ растворения CLC (покадровое изображение)</b>	
<b>Клоны (hFab)</b>	<b>50% растворение (мин))</b>	<b>90% растворение (мин))</b>
g7B07	34,44	135,1
g24F02_N53A_T0	43,7*	>170
g24F02_N53A_2W	45,95*	>170
* Частичная кривая		

Таблица 16: Значения EC50 и EC90 образцов, подвергшихся температурному стрессу (T0 и T2W при 37°C). Расчеты выполнялись с использованием нелинейной регрессии (логарифм (агонист) в зависимости от наклона переменной реакции (четыре параметра)) и представлены в таблице. Результаты представляют собой комбинации результатов одного эксперимента, в котором каждая лунка контролировалась в шести повторях.

#### Характеристика сайта связывания выбранных клонов посредством связывания эпитопов с использованием ELISA

Анализ связывания эпитопов гуманизированных клонов Fab проводили по сравнению с гуманизированным Fab g7B07.

Для этого эксперимента субоптимальную концентрацию биотинилированного клона g7B07, гуманизированного Fab, добавляли в планшет, покрытый Gal10, и предварительно инкубировали с выбранными клонами. Затем определяли процентную конкуренцию с

g7B07 (таблица 17). Мотавизумаб (Mota) в основной цепи Fab человека использовали в качестве отрицательного контроля (0% конкуренции). Клон g7B07 был использован в качестве положительного контроля для определения конкуренции и, следовательно, был установлен как 100%-ный показатель конкуренции. Античеловеческий специфический клон 1D11 (связывающийся с остатком тирозина 69) был включен в исследуемую группу в качестве отрицательного контроля для конкуренции с 7B07 за связывание Gal10, поскольку было известно, что клон 1D11 связывается с противоположной стороной Gal10 (включая тирозин 69).

Клоны (hFab)	Биннинг эпитопов	
	Среднее значение OD	% Конкуренции против g7B07 Biot
g18C06	0,05	105,3
g24F02	0,26	96,5
g24F02_N53A	0,20	99,0
g20H09	0,33	93,2
g23H09	0,31	94,3
g7B07	0,18	100,0
Mota-hFab	2,51	0,0
1D11-hFab	1,55	41,0
Буфер	2,37	6,0

Таблица 17: Биннинг эпитопов выбранных анти-Gal10 клонов против человеческого Fab g7B07, биотинилированного с помощью ELISA. Процент конкуренции против g7B07 hFab Biot определяли, используя значение OD отрицательного контроля мотавизумаба как 0%-ную конкуренцию и значение OD небитинилированного клона g7B07 как 100%-ную конкуренцию.

Результаты подтвердили, что выбранные клоны конкурируют с g7B07 за связывание Gal10 (таблица 17).

#### Характеристика свойств связывания выбранных клонов Fab из трех обнаружений на SPR

Свойства связывания выбранных клонов с Gal10 человека и яванского макака анализировали с помощью метода захвата, установленного на приборе Biacore 3000.

Для этой цели были использованы два подхода. В первом случае две концентрации выбранных клонов наносили на яванского макака (изоформа WGS) Gal10-His, захватывая его на чипе CM5, покрытом моноклональным анти-His антителом. Второй подход включал серийное разведение, которое применяли к Gal10-His человека или яванского макака (изоформа WGS) в той же установке.

На первом этапе перекрестная реактивность панели яванского макака была протестирована путем введения двух концентраций пойманному яванскому макаку Gal10 (изоформа WGS).

Клон g7B07 и его сконструированный вариант g7B07\_N53A показали слабое связывание с изоформой WGS яванского макака Gal10 (KD 69 нМ для g7B07 hFab против 1,5 нМ для g7B07 mIgG1) (таблица 18).

Клон g20H09 показал плохую способность связывания с антигеном яванского макака, тогда как клон g18C06 не продемонстрировал связывания (таблица 18). Однако клоны g23H09, g24F02 и их сконструированный вариант g24F02\_N53A показали хорошую перекрестную реактивность с яванскими макаками (таблица 18).

Дальнейшая характеристика перекрестной реактивности этих клонов с яванскими макаками выявила g24F02\_N53A и g23H09. Действительно, эти два клона показали аффинность 1,4 нМ и 5,34 нМ к Gal10 человека и аффинность 8,0 и 9,9 нМ к Gal10 яванского макака, соответственно. Кроме того, эти два клона (g23H09 и g24F02\_N53A) показали аффинность в 1,7 и 6,3 раза выше, а скорость диссоциации от 1,9 до 3,5 раз выше, чем у клона g7B07. Мутация Asn в положении 53 в CDR2 g24F02\_VH не приводила к уменьшению связывания с Gal10 человека или яванского макака, и наблюдались сходные показатели аффинности и скорости диссоциации.

В соответствии с данными скрининга, клон g18C06 показал наилучшее сродство (1,27 нМ) и скорость диссоциации ( $4,9E-04$  1/с) по сравнению с тестируемой панелью на человеческом Gal10, но не связывался со своим аналогом яванского макака.

Рандомизация 6 аминокислот CDR2 g7B07\_VH, приводящая к образованию g23H09, показала увеличение перекрестной реактивности яванского макака по сравнению с родительским клоном. Однако клон g20H09, выделенный в ходе аналогичной исследовательской кампании, в ходе которой были рандомизированы 3 аминокислоты CDR2, не продемонстрировал такого усиления перекрестной реактивности яванского макака, демонстрируя, что ключевые аминокислоты были введены в CDR2 клона g23H09, что привело к повышенному связыванию с Gal10 яванского макака.



	Определение аффинности (SPR)							
	Человеческий Gal10-His				Gal10-His яванского макака (изоформа WGS)			
Клоны (hFab)	ka (1/мс)	kd (1/с)	Амплитуда R0 (RU)	KD (M)	ka (1/мс)	kd (1/с)	Амплитуда R0 (RU)	KD (M)
g7B07	6,7E+05	6,0E-03	607	9,08	1,9E+06	1,3E-01	64	69,5
g7B07_N53A	5,4E+05	7,9E-02	119	145,00	5,1E+05	2,1E-01	30	417,0
g23H09	5,9E+05	3,1E-03	722	5,34	9,5E+05	9,5E-03	589	9,9
g18C06	3,8E+05	4,9E-04	598	1,27	нет связывания	нет связывания	нет связывания	нет связывания
g24F02	1,1E+06	1,6E-03	644	1,49	1,4E+06	7,8E-03	566	5,4
g24F02_N53A	1,3E+06	1,8E-03	647	1,43	1,1E+06	8,8E-03	544	8,0

Таблица 18: Определения аффинности, определенной с помощью SPR.

#### Краткое изложение результатов примера 4

С учетом всех проанализированных параметров для дальнейшей характеристики были выбраны четыре клона:

**g18C06:** Идентифицирован в процессе «исследования эпитопа 7B07», показал наилучшую скорость реакции с человеческим Gal10 ( $4,9E-04$  1/с), хорошую способность растворять рекомбинантные CLC (76,8% через 5 часов) и соответствующую стабильность (3,1% посттрансляционная модификация, связывание и эффективность не изменились через две недели при 37°C). Несмотря на аналогичную область связывания на Gal10 с g7B07, этот клон не обнаружил связывания с Gal10 яванского макака..

**g23H09:** Этот вариант g7B07, в котором 6 остатков в CDR2 тяжелой цепи были рандомизированы, продемонстрировал сходные свойства связывания с родительским клоном. Помимо приемлемой стабильности (связывание и эффективность не изменяются после двух недель инкубации при 37°C), этот клон показал вторую лучшую эффективность по растворению рекомбинантных CLC (84,1% через 5 часов). Он также продемонстрировал явную перекрестную реактивность у яванскими макака, сродство к изоформе WGS составило 9,9 нМ, что в 7 раз лучше, чем у g7B07, что позволило бы использовать g23H09 для токсикологических исследований на яванских макаках.

**g24F02\_N53A:** Уникальный клон, идентифицированный в результате перетасовки «тяжелой цепи» g7B07, соответствовал всем критериям приемлемости. Возможный сайт дезамидирования, аналогичный обнаруженному в g7B07, был мутирован в аланин. Эффективность и связывающая способность не изменились даже через две недели при 37°C. Обладая 8 нМ сродством к Gal10 яванского макака, этот клон показал хорошую перекрестную реактивность у яванским макака, что позволило бы проводить токсикологические исследования на яванских макаках.

**g20H09:** Этот вариант g7B07, в котором 3 остатка в CDR2 тяжелой цепи были рандомизированы, явно демонстрировал более низкую связывающую способность, чем родительский клон. Несмотря на достаточную стабильность и наилучшую эффективность растворения кристаллов Gal10 (91,4% через 5 часов), этот клон проявлял слабую перекрестную реактивность с Gal10 яванского макака.

Клон	g23H09	g24F02_N53A	g18C06	g20H09
Обнаружения	Рандомизация CDR2 (N6)	Перетасовка тяжелой цепи	Эпитоп типа 7B07	Рандомизация CDR2 (N3)
Аффинность (человек/супонолгус_WGS) посредством SPR	5,34 нМ/9,9 нМ	1,4 нМ/8 нМ	1,27 нМ/нет связывания	17,5 нМ/22 нМ
Скорость диссоциации (человек/супонолгус_WGS) kd1/с посредством SPR	3,1E-03/9,5 E-03	1,8 E-03/8,8 E-03	4,9E-04/нет связывания	1,5E-02/4,6E-02
Эпитоп на Gal10 человека	Перекрытие g7B07			
Исследование стабильности (связывание/эффективность/анализ посттрансляционной модификации) через 2 недели при температуре 37°C	Связывание и эффективность не изменились/>91% немодифицированных CDR2 (не исследовалось для g24F02_N53A)			
Способность растворять гес CLC				
% растворения после 5 часов инкубации	84,10%	n.t	76,80%	91,40%
50% растворение достигается за:	n.t	43,7 минут	n.t	n.t
Потенциальные условия	Нет	Коррекция места дезамидирования (поз. 53_VH)	Нет	Нет
% идентичности V-области человеческого зародыша (ближайший вариант)	98,8	100	100	98,8

% идентичности VH по сравнению с g7B07/количество не одинаковых aa	95%/6 aa	88%/14 aa	78%/27 aa	96%/4 aa
% идентичности VL по сравнению с g7B07/количество не одинаковых aa	100%	100%	56%/48 aa	100%

Таблица 19: Сводные характеристики клонов: g23H09, g24F02\_N53A, g18C06 и g20H09.

### Материалы и протоколы, использованные в примерах 1-4

Анализы растворения лейденских кристаллов Шарко (CLC)

#### Анализ 1:

Очищенный моноклональный Fab поставляли в PBS и хранили при 4°C. Концентрации белка определяли путем измерения поглощения при 280 нм с использованием теоретических коэффициентов экстинкции.

Кристаллы CLC человека получали, как описано Persson et al.5. Вкратце, 5 мл очищенного N-концевого His-меченного человеческого Gal10 в PBS в концентрации 4 мг/мл инкубировали в течение ночи при комнатной температуре с протеазой TEV при соотношении протеаза:мишень 1% (г/г). На следующий день кристаллизацию вызывали встряхиванием раствора (15 с). Кристаллы CLC появляются в течение от 30 минут до 1 часа, в результате чего раствор становится мутным. Этот кристаллический раствор затем хранят при температуре 4°C до дальнейшего использования.

#### Анализ 2:

Очищенные моноклональные Fab поставляли в PBS и хранили при 4°C. Концентрации белка определяли путем измерения поглощения при 280 нм с использованием теоретических коэффициентов экстинкции.

Антитела тестировали при концентрации 250 мкг/мл (n=4) в двух независимых экспериментах, а изображения получали через 2, 5, 7 и 16 часов после добавления антител. Кривая реакции концентрации 1D11 (CRC) включена (n=3) в качестве дополнительного положительного контроля.

Изображения были сегментированы с использованием собственного алгоритма для обнаружения отдельных кристаллов и расчета общей площади кристаллов на лунку.

### PROTOCOLS

#### 1.1 Создание библиотеки для рандомизации CDR2

##### Вложенные PCR

Чтобы создать библиотеки для рандомизации CDR2, были проведены двухэтапные вложенные PCR для амплификации VH клона g7B07 и введения рандомизации 3, 4, 5 остатков (-1 остаток) и контрольных 6 остатков. После расщепления NcoI и NheI продукты PCR лигировали в векторы PCB13 (NheI/NcoI и BstEIII (во избежание самолигирования)), содержащие легкую цепь g7B07, перед электропорацией в TG1 EСС.

#### Двухэтапные вложенные PCR

##### 1ая PCR:

В качестве матрицы использовали g7B07\_VH\_PCB13, раствор с концентрацией 50 нг/мкл готовили в воде 2X MQ.

Праймеры	Последовательность
>7B7NcoIs	ACTGGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAAGTGCAGC (SEQ ID NO: 56)
>7B7NheIs	GTCAGTGCTAGCAGAGCTAACGGTG (SEQ ID NO: 57)

>7B7N3as	AGAGTCGGCGTAGTAGGTGATMNNMNNMNNCTTGATGGCGGACA CCCAT (SEQ ID NO: 58)
>7B7N3s	ATCACCTACTACGCCGACTCT (SEQ ID NO: 59)
>7B7N5as	ACAGAGTCGGCGTAGTAGGTMNNMNNMNNMNNMNNMNNGATGGCGG ACACCCATTCAA (SEQ ID NO: 60)
>7B7N4as	ACAGAGTCGGCGTAGTAGGTMNNMNNMNNMNNMNNGATGGCGGACAC CCATTCAA (SEQ ID NO: 61)
>7B7N5s	ACCTACTACGCCGACTCTGT (SEQ ID NO: 62)
>7B7N6as	ACAGAGTCGGCGTAGTAGGTMNNMNNMNNMNNMNNMNNMNNGATGG CGGACACCCATTCAA (SEQ ID NO: 63)

Таблица 20: Праймеры

Получение реакции первого образца (см. таблицы ниже):

Реагент	Объем реагента на реакцию (мкл)	х9				
ДНК 1ой PCR (20 нг)	1	9	Библиотека N3	PCR1	>7B7NcoIs	>7B7N3as
Олиго 5 мкМ (смысловой)	5	45		PCR2	>7B7NheIas	>7B7N3s
Олиго 5 мкМ (анти- смысловой)	5	45	Библиотека N4	PCR1	>7B7NcoIs	>7B7N4as
dNTP (2 мМ)	5	45		PCR2	>7B7N5s	>7B7NheIas
Буфер для смешивания HF (5x)	10	90	Библиотека N5	PCR1	>7B7NcoIs	>7B7N5as
Диффузионная полимераза	1	9		PCR2	>7B7N5s	>7B7NheIas
H2O (2X MQ)	23	207	Библиотека N6	PCR1	>7B7NcoIs	>7B7N6as
Всего	50	450		PCR2	>7B7N5s	>7B7NheIas

Таблица 21: Компоненты PCR образцов

Затем планшет герметично закрывали и загружали в прибор для PCR.

Программа	°C	Время
30СУС	98	2 мин

	98	30 сек	Денатурирование	30 ЦИКЛОВ
	55	20 сек	Ренатурация	
	72	15 сек	Усиление	
	72	5 мин		
	4	Режим ожидания		

Таблица 22: Условия цикла PCR

Наконец, ДНК продукты 1<sup>ой</sup> PCR выделяли электрофорезом в агарозном геле.

Выделение ДНК электрофорезом в агарозном геле:

1. Готовили 0,8% агарозный гель (комбинация 10 лунок (120 мкл на лунку)).
2. Идентичные продукты PCR объединяли (8 повторов, общий объем 400 мкл) и к смеси добавляли 80 мкл 6-кратного красителя Orange (каталог R0631).
3. После полимеризации гель переносили в систему электрофореза, а резервуар заполняли свежим 1X TEA.
4. Нагрузку (Gene Ruler Mix, 20 мкл) загружали в одну лунку.
5. Затем в каждую лунку (всего 3 лунки) переносили по 120 мкл кДНК.
6. Разделение продолжалось не менее 70 минут при напряжении 200 вольт.
7. Перед тем, как продолжить экстракцию ожидаемых продуктов ДНК (пробирки 15 мл), оценивали правильное разделение продукта.

PCR-очистка:

Очистку продукта PCR, выделенного из агарозного геля, проводили в соответствии с протоколом, прилагаемым к набору NucleoSpin Gel и PCR Clean-up:

1. Продукты PCR взвешивали, затем добавляли буфер NT1 (2 раза больше чем по 100 мг геля, 20-30 минут при температуре 65°C). Раствор оставляли на столе на 15 минут (чтобы остыть), затем загружали в колонки PCR Clean-up и центрифугировали в течение 1 минуты при 11000 g.
2. Элюат отбрасывали, добавляли 700 мкл NT3 для промывки мембраны и колонки центрифугировали в течение 1 минуты при 11000 g. Эту стадию осуществляли дважды.
3. Элюат отбрасывали и колонки центрифугировали в течение 3 минут при 11000 g.
4. Наконец, колонки PCR Clean-up переносили в пробирку емкостью 1,5 мл и элюирование осуществляли добавлением 20 мкл теплой воды MQ (70°C).
5. После стадии инкубации при комнатной температуре (1 минута), колонки центрифугировали в течение 1 минуты при 11000 g и ДНК в элюате определяли с помощью Nanodrop (260 нм).

2<sup>ая</sup> PCR:

Для второй вложенной PCR продукт ДНК готовили из первой вложенной PCR в концентрации 10 нг/мкл.

Праймеры	Последовательность
----------	--------------------

>7B7NcoIs	ACTGGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAAGTGCAGC (SEQ ID NO: 64)
>7B7NheIas	GTCAGTGCTAGCAGAGCTAACGGTG (SEQ ID NO: 65)

Таблица 23: Праймеры

## 1. Подготовка второго PCR:

Реагент	Объем реагента на реакцию (мкл)
ДНК 1ой PCR (20 нг)	1
Олиго 5 мкМ (смысловой)	5
Олиго 5 мкМ (анти-смысловой)	5
dNTP (2 мМ)	5
Буфер для смешивания HF (5X)	10
Диффузионная полимераз	1
H <sub>2</sub> O (2X MQ)	23
Всего	50

Таблица 24: Состав образца PCR

## 2. Затем планшет герметично закрывали и загружали в прибор для PCR.

Программа	°C	Время		
30CYC	98	2 мин		
	98	30 сек	Денатурирование	30 ЦИКЛОВ
	55	20 сек	Ренатурация	
	72	15 сек	Усиление	
	72	5 мин		
	4	Режим ожидания		

Таблица 25: Условия цикла PCR

3. Пока работала программа PCR, был приготовлен 0,8%-ный агарозный гель.

4. В конце программы очистку продуктов ДНК проводили электрофорезом (0,8% агарозный гель) и очистку PCR проводили, как описано выше. Наконец, концентрацию ДНК определяли с помощью Nanodrop.

Расщепление продуктов PCR и вектора, содержащего g7B07\_VL<sub>L</sub>

1. Продукты PCR 2-ой вложенной PCR разводили до концентрации 10 нг/мкл.

	g7B07_VH-N3	g7B07_VH-N4	g7B07_VH-N5	g7B07_VH-N6
ДНК	109,5	102,4	113,3	106,7
Буфер Tango 10X	30	30	30	30



NcoI (10 Ед/мкл)	10	10	10	10
NheI (10 Ед/мкл)	10	10	10	10
H <sub>2</sub> O (2X MQ)	140,5	147,6	136,7	143,3
	300	300	300	300

Таблица 26: Расщепление продуктов PCR

2. Раствор распределяли по 50 мкл в PCR-пробирки (всего 6 пробирок (300 мкл)).
  3. Расщепление проводили в течение 4 часов при температуре 37°C на устройстве PCR (Thermocycler).
  4. По окончании времени инкубации реакции PCR каждой библиотеки объединяли в пробирку объемом 1,5 мл.
  5. Очистку проводили с помощью колонок Nucleospin ((протокол CFR выше, одна колонка на библиотеку).
  6. Элюирование осуществляли с 75 мкл теплой воды с 2X MQ на колонку (всего 150 мкл на 10 мкг).
  7. Затем с помощью Nanodrop определяли концентрацию ДНК.
- Лигирование расщепленного VH с расщепленной PCB13, содержащей VL
- Лигирование расщепленного NcoI/NheI VH (N3-4-5 или 6) осуществляли в расщепленной NcoI/NheI/BstII g7B07\_VL PCB13.

Получение смеси осуществляли в пробирке объемом 1,5 мл (1 пробирка на библиотеку).

Реагент	Объем (мкл)				
	N3	N4	N5	N6	Neg
Расщепленный вектор, 2 мкг	79,1	79,1	79,1	79,1	7,9
Вставка, 1 мкг	17,8	19,8	19,9	20,4	0,0
Буфер для T4 ДНК лигазы (10X)	20	20	20	20	2
T4 ДНК лигаза (5 Ед/мкл)	5	5	5	5	0,5
2X MQ H <sub>2</sub> O	78,2	76,2	76,0	75,5	9,6
Всего	200	200	200	200	20

Таблица 27: Условия реакции лигирования

1. Лигированные продукты инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре или в течение ночи при температуре 16°C.
2. По истечении этого времени инкубации добавляли дополнительную ДНК-лигазу (2,5 мкл T4 ДНК лигазы, 5 мкл буфера для T4 ДНК-лигазы в 50 мкл воды MQ) до общего объема 250 мкл.
3. Наконец, лигирование продолжали в течение 2 часов при температуре 37°C (WaterBath).

4. Затем ДНК очищали на колонках Nucleospin. Для этого к лигированному раствору добавляли 500 мкл буфера NTI, затем переходили к стадиям промывки, описанным ранее. В завершение элюирование осуществляли с 30 мкл теплой воды MilliQ на колонку.

Электропорация для конечных библиотек

День -1:

Восстановительную среду переводили с  $-80^{\circ}\text{C}$  на  $4^{\circ}\text{C}$ .

День 0:

За четыре часа до начала эксперимента восстановительную среду нагревали до температуры  $37^{\circ}\text{C}$  (инкубатор) и кюветы для электропорации Gene Pulser/MicroPulser помещали на лед.

1. Электрокомпетентные клетки (ЕСС, TG1) переносили на лед на 15 минут.

2. Затем к 30 мкл очищенного лигированного продукта (библиотека) добавляли 50 мкл ЕСС.

3. Сверх предыдущего объема добавляли дополнительные 50 мкл ЕСС, чтобы общий объем составил 127 мкл.

4. Затем этот объем разделяли на 3 фракции и по 42 мкл переносили в 3 предварительно охлажденные кюветы BioRad.

5. Для отрицательного контроля готовили разведение 1/10. Из этого предварительного разведения 10 мкл переносили в новую пробирку емкостью 1,5 мл. Затем к предыдущему объему добавляли 20 мкл ЕСС, чтобы общий объем составил 30 мкл.

6. Электропорацию проводили с использованием программы EC1 (значение должно быть выше 4,6, BioRad Micropulser).

7. ЕСС выделяли путем добавления 4 мл предварительно нагретого буфера для восстановления (1 мл на кювету+1 мл, использованный для промывки 3 кювет). Затем раствор переливали в пробирки емкостью 15 мл (всего 4 мл на библиотеку).

8. Культуры инкубировали в течение 30 минут при 180 об/мин и при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ .

9. После инкубации для каждой библиотеки проводили разведение 1/1000 в среде 2TY/ампициллин/глюкоза (новая пробирка объемом 15 мл). Затем на 96-луночном планшете (дно F) проводили серийное разведение 1/10 для достижения разведения  $10^{-07}$ .

10. Наконец, 5 мкл каждого разведения наносили на специальные чашки Петри. Затем планшеты инкубировали в течение ночи при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ .

11. Остальные извлеченные культуры (пробирка 15 мл с 4 мл) использовались для инокуляции 300 мл среды 2TY с 2% глюкозы и ампициллина (предварительно нагретой). Затем культуру инкубировали при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  при встряхивании (110 об/мин) в течение 9 часов.

Получение фагов

Фаговая инфекция:

Из насыщенной библиотеки ночных культур:

1. Добавляли 4 мл к 400 мл 2TY/ампициллина/глюкозы (значение OD должно быть ниже 0,1) и инкубировали при температуре 37°C, 120 об/мин до достижения значения OD 0,5 (около 2 часов).

2. 100 мл этой культуры (100 мл на библиотеку) переносили в новую колбу Эрленмейера емкостью 500 мл.

3. Добавляли 20 мкл фагов-помощников VCSM (исходный объем  $1 \times 10^{13}$  фагов/мл) и культуру инкубировали в течение 30 минут при температуре 37°C 100 мл этой культуры (100 мл на библиотеку) переносили в новую колбу Эрленмейера емкостью 500 мл.

3. Добавляли 20 мкл фагов-помощников VCSM (исходный объем  $1 \times 10^{13}$  фагов/мл) и культуру инкубировали в течение 30 минут при температуре 28°C при встряхивании (110 об/мин).

Выбор фагового дисплея библиотек scFv (Montoyo+Ynigo, каппа+лямбда) для эпитопа g7B07

День 1:

Покрытие:

1. Планшет MaxiSorp покрывали 100 мкл на лунку 25 мкг/мл клона 1D11 (связывающегося с участком Gal10 на противоположной стороне эпитопа g7B07). Контроль PBS был включен в качестве отрицательного контроля.

2. Планшет накрывали герметизирующей лентой и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C.

Получение фагов:

1. Раунд 1: Раствор, содержащий 50 OD ( $1 \text{ OD} = 2 \times 10^8$  клеток/мл) исходного глицеринового исходного материала (клетки TG1, подвергнутые электропорации с конечной библиотекой), добавляли к 650 мл смеси 2TY/2% глюкоза/ампициллин.

Раунд 2: Инфицированные в течение ночи (спасенные в ходе предыдущего раунда отбора) разводили в 15 мл смеси LB/ампициллин/глюкоза 1/100, затем инкубировали при температуре 37°C с встряхиванием (110 об/мин) до достижения A600 около 0,5 (+/- 2 часа).

2. Когда значение OD составляло от 0,5 до 0,6, инициировали стадию фага-хелпера (на этой стадии самая высокая экспрессия пилей на поверхности бактерий обеспечивает хорошее заражение фагом).

3. В каждую пробирку фирмы Falcon (10 мл R1 TG1) добавляли по 10 мкл хелперного фага (VCSM13 (1013), хранившегося в морозильной камере). Смешивать не нужно (соотношение фагов и бактерий должно составлять 10:1, а исходная концентрация  $1 \times 10^{13}$ /мл).

4. Пробирки инкубировали 30 минут при температуре 37°C без встряхивания (инфицирование), а затем центрифугировали 15 минут при 4800 g при комнатной температуре (удаляли супернатант).

5. Осадки ресуспендировали (пробирка 50 мл) в 50 мл 2TY/ампициллин/канамицин (разведение 1/1000) (без глюкозы) в колбе Эрленмейера объемом 250 мл, затем инкубировали в течение ночи при температуре 28°C (110 об/мин).

TG1 инокуляция:

1. В 10 мл среды LB инокулировали одну колонию TG1, выращенную на пластинке с агаром с минимальным содержанием солей в колбе Эрленмейера объемом 50 мл.
2. Культуру инкубировали в течение ночи при 37°C (100 об/мин).

День 2:

Блокада

1. После инкубации в течение ночи планшет с покрытием промывали 3 раза по 300 мкл на лунку 1X PBS 0,05% Tween с помощью многоступенчатой пипетки.
2. Стадию блокады выполняли путем добавления 200 мкл на лунку 1X PBS 2% MARVEL с использованием многоканальной пипетки из одноразового резервуара.
3. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

Преципитация фага:

1. Из ночного роста (TG1, инфицированного фагом-хелпером) 50 мл переносили в новую пробирку емкостью 50 мл и центрифугировали в течение 15 минут (4800 g) при 4°C (раунд 1: 2×50 мл).
2. Супернатант собирали и 40 мл переносили в новую пробирку емкостью 50 мл, содержащую 10 мл холодного раствора 20% ПЭГ6000/2,5 М NaCl (преципитация фагов).
3. Затем пробирки инкубировали на льду в течение 30 минут.
4. Преципитацию фага осуществляли центрифугированием в течение 15 минут при 4800 g.
4. Преципитацию фага осуществляли центрифугированием в течение 15 минут при 4800 g.
5. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 1 мл стерильного PBS и переносили в новую стерильную пробирку емкостью 1,5 мл.
6. Затем пробирки центрифугировали в течение 3 минут на максимальной скорости (настольная центрифуга).
7. Супернатант собирали и добавляли в новую пробирку Эппендорфа, содержащую 250 мкл смеси 20% ПЭГ/2,5 М NaCl, а затем инкубировали на льду в течение 15 минут.
8. Пробирки центрифугировали в течение 3 минут на максимальной скорости и супернатант удаляли.
9. Осадок ресуспендировали в PBS (раунд 1: 500 мкл на каждую пробирку, наконец, объединенные; раунд 2: 1 мл).
10. В качестве дополнительной стадии раствор центрифугировали в течение 3 минут на максимальной скорости для осаждения остаточного клеточного дебриса. Супернатант (фаги) собирали в новую пробирку объемом 1,5 мл для создания INPUT.
11. Из этого исходного раствора готовили глицериновую массу (800 мкл фагов в 400 мкл 60% глицерина).

Захват Gal10 на пластине с покрытием Maxisorp, покрытой клоном 1D11:

1. Блокирующий буфер покрытой пластины удаляли, переворачивая пластину и постукивая ею по листу бумаги.

2. Добавляли 100 мкл на лунку 5 мкг/мл Gal10-His в 0,2% MARVEL..

3. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

Выбор фага:

1. Раунд 1: 10 мкл фага/селекция (90 мкл PBS 0,2% MARVEL+10 мкл фагов).

2. Раунд 2: 1 мкл фага/селекция (99 мкл PBS 0,2% MARVEL+1 мкл фагов).

3. Блокирующий буфер удаляли из 96-луночного планшета, переворачивая его и постукивая им по листу бумаги, и добавляли 100 мкл разведенных фагов.

4. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

5. Через 2 часа инкубации супернатант удаляли из планшета (пипеткой).

6. Лунки тщательно промывали (200 мкл/лунка) (всего 25 раз).

a. 5 раз по 200 мкл PBS/Tween 0,05%.

Перед герметизацией и инкубированием в течение 5 минут при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

Эту стадию осуществляли 4 раза.

b. Затем лунки промывали 3 раза по 200 мкл PBS, затем приступали к стадии элюирования.

Элюирование: Трипсин:

1. Удаляли PBS и осуществляли элюирование с 150 мкл на лунку of трипсин (10 мг/мл).

2. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

3. По истечении этого времени инкубирования 150 мкл элюирующего раствора переносили в соответствующие лунки 96-луночного планшета с V-образным дном, содержащего в каждой лунке 7,5 мкл AEBSF (ингибитора трипсина). Затем раствор перемешивали 5 раз, чтобы обеспечить надлежащую нейтрализацию трипсина (поднимание и опускание пипетки).

Элюирование: Конкурентное элюирование:

1. Конкурентное элюирование осуществляли путем добавления 100 мкл на лунку 2,5 мг/мл 7B07 или Motavizumab (изотипический контроль) в 0,2% MARVEL.

2. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

3. По истечении этого времени инкубирования элюирующий раствор переносили в новый 96-луночный планшет.

Инфицирование/сохранение:

Сохранение (50 мл-овые пробирки):

1. 300 мкл клеток TG1 (значения OD около 0,5) добавляли в 50 мл-овую пробирку, содержащую 625 мкл 2TY и 75 мкл элюированных фагов (элюирование трипсином или конкурентное элюирование).

2. Пробирки инкубировали в течение 30 минут при температуре 37°C без встряхивания.

3. В конце периода инкубации в каждую 50-мл пробирку, содержащую TG1/фаги, добавляли 10 мл смеси LB/ампициллин/2% глюкозы.

4. Затем пробирки инкубировали в течение ночи при температуре 37°C при встряхивании (110 об/мин).

#### Точечное нанесение:

1. Разведение для точечного нанесения:

a. INPUT: Серию разведений фагов (INPUT) для точечного нанесения осуществляли в 2ТҮ (чашка с агаром LB).

12 серий разведений для точечного нанесения (1/10) осуществляли в 2ТҮ (5 мкл фагов в 45 мкл 2ТҮ) (от  $10^{-1}$  до  $10^{-12}$ ).

b. OUTPUT: Серию разведений фагов (OUTPUT) для точечного нанесения осуществляли в 2ТҮ (чашка с агаром LB).

6 серий разведений для точечного нанесения (1/10) осуществляли в 2ТҮ (5 мкл фагов в 45 мкл 2ТҮ) (от  $10^{-1}$  до  $10^{-6}$ ).

2. Затем 50 мкл клеток TG1 (значения OD около 0,5) добавляли к 50 мкл фагов в планшетах для разведения (INPUT и OUTPUT).

3. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 30 минут при температуре 37°C, без встряхивания.

4. По 5 мкл каждого разведения (INPUT: от  $10^{-6}$  до  $10^{-12}$ ; OUTPUT: от  $10^{-1}$  до  $10^{-6}$ ) наносили на сухую чашку Петри (LB/ампициллин/глюкоза).

День 3:

1. Контролировали наличие одиночных колоний на чашках для нанесения пятен.

2. Были подготовлены запасы глицерина на ночь (1 мл культур+500 мкл 60%-ного глицерина в криопробирках, хранящихся при температуре -80°C).

#### Генерация мастер-таблицы:

1. Из соответствующих растворов готовили серию разведений в 2ТҮ.

6 серий разведений для точечного нанесения (1/10) осуществляли в 2ТҮ (5 мкл фагов в 45 мкл 2ТҮ) (от  $10^{-1}$  до  $10^{-6}$ ).

2. 50 мкл выбранного разведения ( $10^{-3}/10^{-4}$ ) переносили в чашки Петри, содержащие твердую агаризованную среду LB с 2% глюкозы и ампициллином.

3. Гомогенное распределение клеток TG1 обеспечивали встряхиванием стеклянных шариков.

4. Гранулы удаляли, а чашки Петри инкубировали в течение ночи при температуре 37°C.

День 4:

1. После инкубации в течение ночи отдельные колонии собирали наконечниками р10 и переносили в 96-луночные планшеты с плоским дном, содержащие 100 мкл среды LB, дополненной 2% глюкозы и ампициллина.

2. Планшет герметично закрывали воздухопроницаемой герметизирующей лентой и инкубировали в течение 5 часов при температуре 37°C и 120 об/мин.

Фаговый дисплей перетасовки тяжелых цепей и рандомизации CDR2

День 1:

Покрытие (перетасовка тяжелой цепи):

1. Планшет Maxisorp покрывали 100 мкл Gal10-His человека или немеченого Gal10 человека, разведенного в 1X PBS:

Раунд 1 и раунд 2: 10 мкг/мл и 1 мкг/мл человеческого Gal10-His.

Раунд 3 и раунд 4: 5 мкг/мл и 0,5 мкг/мл Gal10-His человека и Gal10.

В качестве контроля были включены условия без покрытия (PBS) и нерелевантный His-меченный белок (mCD11c-His R&D, кат. № 7987-AX).

2. Планшет покрывали герметизирующей лентой и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C.

Покрытие (рандомизация CDR2):

1. Планшет Maxisorp покрывали 100 мкл Gal10-His человека, разведенного в 1X PBS:

Раунд 1 и раунд 2: 10 мкг/мл и 1 мкг/мл человеческого Gal10-His, разведенного в 1X PBS),

В качестве контроля были включены условия без покрытия (PBS) и нерелевантный His-меченный белок (mCD11c-His R&D, кат. № 7987-AX).

2. Планшет покрывали герметизирующей лентой и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C.

Получение фагов:

1. Инфицированные ночные культуры (сохраненные из предыдущего раунда отбора) разводили 1/100 в 15 мл смеси LB/ампициллин/глюкоза, затем инкубировали при температуре 37°C со встряхиванием (110 об/мин) до тех пор, пока значение OD (A600) не приблизилось к 0,5 (+/- 2 часа).

2. Когда значение OD составляло от 0,5 до 0,6, инициировалась стадия фага-хелпера (на этой стадии самая высокая экспрессия пилей на поверхности бактерий обеспечивает хорошее инфицирование фагом).

3. В каждую пробирку фирмы Falcon (10 мл R1-TG1) добавляли 10 мкл фага-хелпера (VCSM13 ( $10^{13}$ ), хранившегося в морозильной камере). Необходимости смешивать не было (соотношение фаг:бактерии должно быть 10:1, исходная концентрация  $1 \times 10^{13}$ /мл).

4. Пробирки инкубировали 30 минут при температуре 37°C без встряхивания (инфицирование), затем центрифугировали 15 минут при 4800 g при комнатной температуре (супернатант удаляли).

5. Осадок ресуспендировали (пробирка 50 мл) в 50 мл смеси 2TY/ампициллин/канамицин (разведение 1/1000) (без глюкозы) в колбе Эрленмейера объемом 250 мл, затем инкубировали в течение ночи при температуре 28°C (110 об/мин).

TG1 инокуляция:

1. 10 мл среды LB инокулировали одной колонией, выращенной на пластинке с агаром с минимальным содержанием солей, в колбе Эрленмейера объемом 50 мл.
2. Культуру инкубировали в течение ночи при температуре 37°C (100 об/мин).

День 2:

#### Блокада

1. После инкубирования в течение ночи планшет с покрытием промывали 3 раза по 300 мкл на лунку 1X PBS 0,05% Tween с помощью многоступенчатой пипетки.
2. Стадию блокирования выполняли путем добавления 200 мкл на лунку 1X PBS 2% MARVEL с использованием многоканальной пипетки из одноразового резервуара.
3. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

#### Преципитация фага:

1. Из ночного роста (TG1, инфицированного фагом-хелпером) 50 мл переносили в новую пробирку объемом 50 мл и центрифугировали в течение 15 минут (4800 g) при температуре 4°C (раунд 1: 2×50 мл).
2. Собирали супернатант и 40 мл переносили в новую пробирку объемом 50 мл, содержащую 10 мл холодного раствора 20% PEG6000/2,5 M NaCl (преципитация фагов).
3. Затем пробирки инкубировали на льду в течение 30 минут.
4. Преципитацию фага осуществляли центрифугированием в течение 15 минут при 4800 g.
5. Супернатант удаляли и осадок ресуспендировали в 1 мл стерильного PBS и переносили в новую стерильную пробирку объемом 1,5 мл.
6. Пробирки затем центрифугировали в течение 3 минут на максимальной скорости (настольная центрифуга).
7. Собирали супернатант и помещали в новую пробирку Эппендорфа, содержащую 250 мкл раствора 20% PEG/2,5M NaCl, затем инкубировали на льду в течение 15 минут.
8. Пробирки центрифугировали в течение 3 минут на максимальной скорости и супернатант удаляли.
9. Осадок ресуспендировали в PBS (раунд 1: 500 мкл на пробирку, окончательно наполненную; раунд 2: 1 мл).
10. В качестве дополнительной стадии раствор центрифугировали в течение 3 минут, на максимальной скорости, для осаждения остаточного клеточного дебриса. Супернатант собирали (фаги) в новую пробирку объемом 1,5 мл для создания INPUT.
11. Из этого маточного раствора был приготовлен исходный глицерин (800 мкл фагов в 400 мкл 60%-ного глицерина).

#### Выбор фага:

1. Использовали 1 мкл фага, разведенного в MARVEL (495 мкл PBS 2% MARVEL+5 мкл фагов) из INPUT 2-го, 3-го и 4-го раундов отбора.
2. Блокирующий буфер удаляли из 96-луночных планшетов, переворачивая его и постукивая им по листу бумаги, и добавляли 100 мкл разведенных фагов.



3. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

4. Через 2 часа инкубирования супернатант удаляли из планшета (пипеткой).

5. Лунки тщательно промывали (200 мкл/лунка) (всего 25 раз).

a. 5 раз по 200 мкл PBS/Tween 0,05%.

Перед герметизацией и инкубацией в течение 5 минут при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

Эту стадию осуществляли 4 раза.

b. Затем лунки промывали 3 раза по 200 мкл PBS, затем приступали к стадии элюирования.

#### Условия промывки со скоростью диссоциации:

1. В каждую выбранную лунку добавляли по 150 мкл 50-100 мкг/мл Gal10-His или растворимого Gal10.

2. Планшет инкубировали в течение ночи или до 2 дней при температуре 37°C при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

3. По истечении времени инкубации лунки промывали 5 раз 200 мкл PBS.

#### Элюирование:

1. Удаляли PBS и элюирование осуществляли с 150 мкл на лунку трипсина (10 мг/мл).

2. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

3. По истечении этого времени инкубирования 150 элюирующего раствора переносили в соответствующие лунки 96-луночного планшета с V-образным дном, содержащего в каждой лунке 7,5 мкл AEBSF (ингибитора трипсина). Затем раствор перемешивали 5 раз, чтобы обеспечить надлежащую нейтрализацию трипсина (капайте пипеткой вверх и вниз).

#### Инфицирование/сохранение:

Сохранение (50 мл-овые пробирки):

1. 300 мкл клеток TG1 (значения OD около 0,5) добавляли в 50 мл-овую пробирку, содержащую 625 мкл 2TY и 75 мкл элюированных фагов (элюирование трипсином или конкурентное элюирование).

2. Пробирки инкубировали в течение 30 минут при температуре 37°C без встряхивания.

3. В конце периода инкубации в каждую 50-мл пробирку, содержащую TG1/фаги, добавляли 10 мл смеси LB/ампициллин/2% глюкозы.

4. Затем пробирки инкубировали в течение ночи при температуре 37°C при встряхивании (110 об/мин).

#### Точечное нанесение:

1. Разведение для точечного нанесения:

a. INPUT: Серию разведений фагов (INPUT) для точечного нанесения осуществляли в 2ТҮ (чашка с агаром LB). 12 серий разведений для точечного нанесения (1/10) осуществляли в 2ТҮ (5 мкл фагов в 45 мкл 2ТҮ) (от  $10^{-1}$  до  $10^{-12}$ ).

b. OUTPUT: Серию разведений фагов (OUTPUT) для точечного нанесения осуществляли в 2ТҮ (чашка с агаром LB).

6 серий разведений для точечного нанесения (1/10) осуществляли в 2ТҮ (5 мкл фагов в 45 мкл 2ТҮ) (от  $10^{-1}$  до  $10^{-6}$ ).

2. Затем 50 мкл клеток TG1 (значения OD около 0,5) добавляли к 50 мкл фагов в планшетах для разведения (INPUT и OUTPUT).

3. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 30 минут при температуре 37°C, без встряхивания.

4. По 5 мкл каждого разведения (INPUT: от  $10^{-6}$  до  $10^{-12}$ ; OUTPUT: от  $10^{-1}$  до  $10^{-6}$ ) наносили на сухую чашку Петри (LB/ампициллин/глюкоза).

День 3:

1. Контролировали наличие одиночных колоний на чашках для нанесения пятен.

2. Делали запасы глицерина для ночных сохранений (1 мл культур+500 мкл 60%-ного глицерина в криопробирках, хранившихся при температуре -80°C).

Генерация мастер-таблицы:

1. Из соответствующих растворов готовили серию разведений в 2ТҮ.

6 серий разведений для точечного нанесения (1/10) осуществляли в 2ТҮ (5 мкл фагов в 45 мкл 2ТҮ) (от  $10^{-1}$  до  $10^{-6}$ ).

2. 50 мкл выбранного разведения ( $10^{-3}/10^{-4}$ ) переносили на чашки Петри, содержащие твердую среду LB с 2% глюкозы и ампициллином.

3. Гомогенное распределение клеток TG1 обеспечивали встряхиванием стеклянных шариков.

4. Гранулы удаляли, а чашки Петри инкубировали в течение ночи при температуре 37°C.

Получение и очистка анти-Gal10-лидов (Fab)

Получение периплазматических экстрактов

День 1:

Инокуляция:

1. Мастер-планшет инкубировали при температуре 37°C при встряхивании (110 об/мин).

2. в каждую лунку 96-луночного планшета с V-образным дном добавляли 1 мл смеси 2ТҮ/ампициллин/0,1% глюкозы, затем инкубировали при температуре 37°C при встряхивании (110 об/мин) в течение 15 минут.

3. Затем к 1 мл среды на планшете с глубокими лунками добавляли 10 мкл бактерий из мастер-планшета.

4. Планшет затем инкубировали при температуре 37°C при встряхивании (110 об/мин) до достижения значения OD<sub>600</sub> около 0,8-1,0 (6-7 ч).

Индукция продукции:

1. Чтобы индуцировать продукцию scFv или Fab, добавляли 100 мкл на лунку IPTG (10 mM IPTG в 2TY+ампициллин; конечная концентрация в лунках=+/- 1 mM IPTG).

2. Планшет инкубировали в течение ночи при температуре 26°C при встряхивании (110 об/мин).

## День 2:

1. На следующий день планшет с 96 глубокими лунками центрифугировали при 4800 g в течение 15 минут охлаждаемой до температуры 4°C центрифуге для осаждения бактерий.

2. Среду удалили (сливали и сушили на бумаге).

3. Планшет герметично закрывали и хранили в течение ночи при температуре -20°C.

## День 3:

1. Планшет перемещали от температуры -20°C до -80°C в течение по меньшей мере 1 часа.

2. Бактериальный осадок оттаивали при комнатной температуре в течение 30 минут.

3. Осадок ресуспендировали в 110 мкл PBS на лунку, затем встряхивали в течение 1 минуты.

4. Планшет инкубировали в течение 90 минут при комнатной температуре на шейкере (900 об/мин).

5. По истечении этого времени инкубирования бактерии затем центрифугировали (4800 g, 15 минут, 4°C).

6. Супернатант (scFv или Fab per) переносили в новый 96-луночный планшет с V-образным дном.

7. Хранение периплазматической фракции, содержащей клоны scFv или Fab, осуществляли при температуре -20°C.

Реклонирование последовательностей VH и VL в основную цепь Fab-фрагмента человека

## Дизайн цепи ДНК

1. С помощью программного обеспечения AbAligner (без номера версии) VH и VL были выровнены и сравнены с ближайшим вариантом зародышевой линии человека.

2. Области CDR (+1 остаток перед CDR1 и 3) были трансплантированы в области FW варианта зародышевой линии.

3. Оптимизацию нуклеотидной последовательности для производства у человека проводили с помощью инструментов GeneArt® (Life Technologies™).

4. Затем к 5' и 3' оптимизированной аминокислотной последовательности были добавлены сайты рестрикции BsmBI для повторного клонирования в векторах pUPEX.

5. Наконец, цепи ДНК были заказаны в компании Life Technologies™ (Thermo Fisher Scientific™).

Расщепление цепочек ДНК с помощью BsmBI

1. Для каждого клона 200 нг VH и VL расщепляли с помощью BsmBI в буфере Tango 10x в конечном объеме 20 мкл.

2. Смесь готовили согласно приведенной ниже таблице и распределяли по 10 мкл на лунку в соответствии с расположением планшета для PCR.

3. Затем планшет для PCR инкубировали в течение 2 часов при температуре 37°C (в термоциклере).

Реагент	Объем (мкл)
ДНК	10
DTT 10 мМ	2
Буфер Tango	2
BsmBI	0,5
Вода MilliQ	5,5
Всего	20

Таблица 28: Условия цикла PCR

PCR очистка расщепленного ДНК

Очистку расщепленных цепей проводили в соответствии с протоколом, прилагаемым к набору NucleoSpin Gel и PCR Clean-up:

1. После 2 часов инкубации при температуре 37°C к каждой расщепленной цепочке ДНК добавляли 80 мкл воды MQ, затем добавляли 200 мкл буфера NT1, затем переносили в колонку для очистки PCR и центрифугировали в течение 1 минуты при 11000 g.

2. Элюат отбрасывали, добавляли 700 мкл NT3 для промывки мембраны, и колонки центрифугировали в течение 1 минуты при 11000 g. Эту стадию осуществляли дважды.

3. Элюат отбрасывали и колонки центрифугировали в течение 3 минут при 11000 g.

4. Наконец, колонки PCR Clean-up переносили в пробирку объемом 1,5 мл и элюирование осуществляли добавлением 25 мкл теплой воды MQ (70°C).

5. После стадии инкубирования при комнатной температуре (1 минута) колонки центрифугировали в течение 1 минуты при 11000 g и ДНК в элюате определяли с помощью Nanodrop (260 нМ).

Лигирование расщепленной ДНК с вектором тяжелой и легкой цепи

1. Расщепленные VH/VL (BsmBI) были вставлены в:

a. вектор человеческого домена CH1, расщепленный BsmBI (pUPEX86), для VH.

b. человеческий лямбда-расщепленный BsmBI вектор (pUPEX116.9) для VL.

2. Смесь для лигирования готовили в пробирке объемом 1,5 мл в соотношении 1:5 (вектор:вставка) согласно таблице ниже.

Реагенты	Объем (мкл)
ДНК, расщепленная BsmBI (вставка) (40 нг)	6
Вектор pUPEX, расщепленный BsmBI (10 нг)	1
Буфер для T4 ДНК лигазы (10X)	1,5

Т4 ДНК лигаза (5 Ед/мкл)	1,5
Вода MQ	5
Всего	15

Таблица 29: Условия лигирования

3. Смеси для лигирования инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа.

#### Трансформация в компетентных клетках Top10

Трансформацию каждого лигированного продукта в компетентные клетки Top10 осуществляли посредством теплового шока.

1. После 1 часа инкубации смесь для лигирования переносили на лед на 5 минут.
2. Компетентные клетки Top10 оттаивали на льду и к 15 мкл каждого лигированного продукта добавляли 40 мкл клеток Top10.
3. Пробирки переносили на лед на 5 минут.
4. Трансформацию компетентных клеток Top10 осуществляли тепловым шоком: 90 секунд при температуре 42°C на теплой водяной бане.
5. Затем пробирки инкубировали в течение 1-2 минут на льду.
6. Наконец, трансформированные клетки Top10 переносили на чашки Петри, содержащие твердую среду LB с 2% глюкозы и ампициллином (ген устойчивости векторов).
7. Гомогенное распределение клеток осуществляли встряхиванием стеклянных шариков.
8. Гранулы удаляли, а чашки Петри инкубировали в течение ночи при температуре 37°C.

#### Сбор и секвенирование колоний

1. После одной ночи инкубации лигированные продукты показали большое количество одиночных колоний бактерий, тогда как в отрицательном контроле (пустые векторы) колоний не наблюдалось или было мало.
2. Для VN или VL 8 одиночных колоний собирали наконечниками р10 и переносили в 96-луночный планшет с плоским дном, содержащий 100 мкл среды LB, дополненной 2% глюкозы и 1/1000 ампициллина.
3. Планшет герметично закрывали воздухопроницаемой герметизирующей лентой и инкубировали в течение 5 часов при температуре 37°C at 120 об/мин.
4. Наконец, 10 мкл каждого клона переносили в планшет для секвенирования (96-луночный планшет с плоским дном, содержащий твердую среду LB+2% глюкозы и 1/1000 ампициллина).
5. Планшет для секвенирования отправили в геномную компанию LGC (праймеры р90).

6. Последовательности ДНК, полученные из геномной LGC, анализировали с помощью программного обеспечения Clone Manager версии № 9. Последовательность каждого клона выравнивали и сравнивали с упорядоченной последовательностью.

7. Отбирали клоны, которые имели последовательности ДНК, аналогичные родительской последовательности (нити ДНК).

#### Аmplификация и MidiPrep:

1. Для каждой конструкции до полудня проводили инокуляцию 20 мкл культуры в 10 мл среды LB, содержащей 2% глюкозы и 1/1000 ампициллина.

2. Культуры инкубировали при температуре 37°C, 120 об/мин.

3. Вечером культуры переносили в 100 мл+1/1000 ампициллина (без глюкозы, так как она может помешать секвенированию MidiPrep DNA, и pUPEX векторы не требуют глюкозы).

4. Культуры инкубировали в течение ночи при температуре 37°C, 120 об/мин.

MidiPrep проводили согласно протоколу, прилагаемому к набору:

1. Культуры объемом 110 мл осаждали центрифугированием (15 минут при 4800 g, 4°C).

2. Супернатант удаляли, осадки ресуспендировали (перемешивали и пипетировали) в 8 мл буфера RES с РНКазой.

3. Добавляли 8 мл буфера LYS, каждую пробирку переворачивали 5 раз (не перемешивая на вортексе), пока раствор не стал полностью синим, и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре.

4. Добавляли 8 мл буфера NEU и перемешивали до тех пор, пока раствор не стал белым.

5. Колонки и фильтры NucleonBond Xtra Midi уравнивали 12 мл буфера EQU.

6. Бактериальный раствор осторожно и медленно переносили на границу уравновешенных колонок.

7. Первую промывку проводили 5 мл буфера EQU, после полного элюирования фильтр колонки NucleonBond Xtra удаляли и вторую промывку проводили 8 мл буфера WASH.

8. Затем колонки переносили в пробирку емкостью 50 мл и элюировали 5 мл буфера ELU.

9. Осаждение ДНК проводили добавлением 3,5 мл изопропанола. Пробирки встряхивали и центрифугировали в течение 30 минут при 4800 g, 4°C.

10. Супернатант удалили и добавили 2 мл 70% этанола.

11. Пробирки центрифугировали в течение 30 минут при температуре 4800 g, 4°C.

12. Супернатант удаляли и осадок сушили при комнатной температуре в течение 1 часа.

13. Наконец, для ресуспендирования осадка добавляли 100 мкл воды 2XMQ и после инкубации в течение 30 минут при комнатной температуре со встряхиванием (900 об/мин) определяли концентрацию ДНК на Nanodrop.

Продукция клонов анти-галектина-10Трансфекция клеток НЕК293Е

День 1:

1. Клетки НЕК293Е высевали в концентрации  $0,3E+06$  клеток/мл.

День 2:

Для клона анти-Gal10 готовили пробирку объемом 15 мл, содержащую +/- 7,6 мл предварительно нагретой (37°C) среды OptiMem.

	/мл культуры
ДНК	0,5 мкг
Среда OptiMem	20 мкл-40 мкл
PEI	1,5 мкл

Таблица 30: Составляющие трансформации

1. DNA MidiPrep VH и VL добавляли в соотношении 1:3 до конечного количества 100 мкг (25 мкг VH+75 мкг VL).

2. Наконец, в пробирку по каплям добавляли 300 мкг PEI и кратковременно перемешивали на встряхивании.

3. Смесь среда/ДНК/PEI инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре, затем добавляли к 200 мл культур НЕК293Е.

4. Наконец, клетки снова помещали в инкубатор (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 120 об/мин).

5. Через 4 часа после трансфекции к каждой культуре добавляли предварительно нагретую (37°C) 1/20 Нурер 1510.

6. Через 6 дней продукции всю среду для каждого клона анти-Gal10 собирали в пробирки емкостью 50 мл.

7. Пробирки центрифугировали в течение 10 минут при 1000 g и 4°C и супернатант переносили в новую пробирку объемом 50 мл пробирка.

Очистка полученных анти-Gal10 Fab с использованием шариков Capture Select IgG-CH1

Очистку полученных Fab проводили с использованием шариков Capture Select IgG-CH1.

День 1:

1. Шарик CaptureSelect IgG-CH1 уравнивали трехкратным промыванием PBS в пробирке емкостью 50 мл и получали 50% суспензию в PBS.

2. 500 мкл уравновешенных 50% шариков суспензии добавляли в пробирку емкостью 50 мл, содержащую супернатант культур НЕК.

3. Пробирки инкубировали в течение ночи при температуре 4°C на роторе (19 об/мин).

День 2:

1. Шарик раскручивали (630 г, 2 минуты, 4°C, ускорение=9, замедление=7).

2. Супернатант собирали в новую пробирку емкостью 50 мл.

3. К шарикам (по бокам фирмы Falcon) добавляли 1 мл 1X PBS; повторно суспендировали; и переносили на колонку (1 колонка на 100 мл культуры НЕК).

4. Для промывки пробирок перед переносом в колонку использовали 4 мл 1X PBS.

5. Стадии промывки повторяли дважды.

6. Колонки промывали 5 раз по 5 мл 1X PBS.

7. На стадии промывки готовили три пробирки по 2 мл на каждый клон и в каждую пробирку добавляли по 100 мкл нейтрализующего раствора (1 M Tris, pH 8).

8. Для элюирования колонки переносили в пробирку емкостью 2 мл (содержащую нейтрализующий раствор и добавляли 1 мл элюирующего раствора (0,1 M глицина, pH 3). После полного элюирования колонки переносили в другую пробирку емкостью 2 мл и элюирование повторяли 2 раза. Пробирки тщательно перемешивали, чтобы обеспечить хорошую нейтрализацию элюирующего раствора.

9. Затем концентрацию белка в каждой элюируемой фракции определяли с помощью Nanodrop (280 нм).

10. Замену буфера осуществляли путем загрузки 4 мл на центробежный фильтр Amicon Ultra 4. Затем колонки центрифугировали в течение 15 минут при 4000 g и 4°C, проток сливали и в верхнюю камеру добавляли 5 мл 1X PBS. Колонки снова центрифугировали и промывали 5 раз в общей сложности 5 мл 1X PBS.

11. Затем концентрацию белка измеряли на Nanodrop и корректировали с учетом коэффициента экстинкции каждого клона.

#### Скрининг и характеристика связывания и связывания эпитопов молекул анти-Gal10 с помощью ELISA

Скрининг связывающих свойств периплазматических экстрактов scFv или Fab

Связывание ELISA

День 1:

1. Планшет Maxisorp покрывали 100 мкл на лунку человеческого Gal10-His (0,5 мкг/мл, разбавлен в 1X PBS).

2. Планшет герметично закрывали герметизирующей лентой и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C.

День 2:

1. На следующий день планшет промывали 5 раз по 300 мкл на лунку 1X PBS 0,05% Tween.

2. Затем добавляли по 300 мкл на лунку блокирующего раствора (1X PBS 1% казеин)

3. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

4. Во время инкубации периплазматические экстракты из периплазматических мастер-планшетов (PMP) разводили 1 к 5 в 1X PBS-0,1% казеина в 96-луночном U-образном планшете Microplate.

5. После 2 часов инкубации с блокирующим раствором планшет промывали 5 раз по 300 мкл на лунку 1X PBS 0,05% Tween.



6. С помощью многоканальной пипетки объемом 200 мкл по 100 мкл на лунку каждого разбавленного scFv-периплазматического экстракта переносили из планшета для разведения в планшет с покрытием.

7. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

8. В течение этого времени инкубации готовили детектирующее антитело (кроличье анти-Мус-HRP, конъюгированное, 1/2000) в достаточном объеме 1X PBS-0,1% казеина.

9. После 1 часа инкубации планшет промывали 5 раз по 300 мкл на лунку 1X PBS 0,05% Tween.

10. С помощью многоканальной пипетки емкостью 200 мкл в покрытый планшет переносили 100 мкл детектирующего антитела на лунку.

11. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

12. За 15 минут до окончания времени инкубации раствор ТМБ переносили при комнатной температуре.

13. После инкубации планшет 5 раз промывали 300 мкл 11 лунок 1X PBS 0,05% Tween.

14. С помощью многоканальной пипетки емкостью 200 мкл добавляли по 100 мкл ТМБ на лунку и инкубировали в течение 5 минут при встряхивании со скоростью 450 об/мин, а затем реакцию останавливали добавлением 100 мкл 0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> на лунку.

15. Затем измеряли поглощение при длине волны 450 нм (эталонная длина волны 620 нм) с помощью прибора Тесан и программного обеспечения Magellan версии № 7.2.

#### Конкурентное ELISA ((связывание с эпитопом 7B07)

Сначала пластинку Maxisorp покрыли 7B07 hIgG1, где захватывается hGal10-His. Затем добавляли периплазматические экстракты, разведенные в соотношении 1/5. Обнаружение осуществлялось с помощью кроличьего антитела против Мус-HRP.

День 1:

1. Планшет Maxisorp покрывали 100 мкл на лунку 7B07\_hIgG1 (3 мкг/мл, разведенного в 1X PBS).

2. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C.

День 2:

1. Планшет промывали 5 раз 300 мкл на лунку 1X PBS 0,05% Tween.

2. Стадию блокировки осуществляли путем добавления 300 мкл на лунку 1X PBS-1% казеина.

3. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

4. По истечении этого времени инкубирования планшет промывали 5 раз по 300 мкл на лунку 1X PBS-0,05% Tween.

5. Затем добавляли 1 мкг/мл человеческого Gal10-His (100 мкл на лунку, разведенного в 1X PBS-0,1% казеина).
6. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.
7. Во время инкубации разведение 1 к 5 выбранного периплазматического экстракта scFv/Fab готовили в 1X PBS-0,1% казеина в отдельном 96-луночном планшете Microplate с U-образным дном.
8. После 1 часа инкубации с Gal10-His планшет промывали 5 раз по 300 мкл на лунку 1X PBS-0,05% Tween.
9. Затем с помощью многоканальной пипетки объемом 200 мкл в покрытый планшет добавляли по 100 мкл каждого периплазматического экстракта.
10. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.
11. По истечении этого времени инкубирования планшет промывали 5 раз по 300 мкл на лунку 1X PBS-0,05% Tween.
12. Определение осуществляли путем добавления 100 мкл на лунку конъюгата Rabbit Anti Мус HRP, разведенного в 1X PBS-0,1% казеина.
13. Планшет герметично закрывали и инкубировали 1 часа при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.
14. За 15 минут до окончания времени инкубации ТМВ перемещали в комнатную температуру.
15. Затем планшет промывали 5 раз по 300 мкл на лунку 1X PBS-0,05% Tween.
16. Наконец, с помощью многоканальной пипетки объемом 200 мкл в планшет добавляли по 100 мкл ТМВ на лунку. Реакцию оставляли на 5 минут при встряхивании со скоростью 450 об/мин и останавливали добавлением 100 мкл 0,5 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> на лунку.
17. Поглощение измеряли при 450 нм (эталон при 620 нм) с помощью прибора Тесан.

#### Скрининг связывающих свойств Fab

Биннинг эпитопов

День 1:

1. А Планшет Maxisorp покрывали 100 мкл Gal10-His человека (1,25 мкг/мл, разведенного в 1X PBS).
2. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение ночи при температуре 4°C.

День 2:

1. Планшет промывали 3 раза по 300 мкл на лунку 1X PBS-0,05% Tween.
2. Стадию блокировки осуществляли путем добавления 300 мкл на лунку 1X PBS-1% казеина.
3. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

4. В течение этого времени инкубации готовили разведение выбранных Fab в концентрации 40 мкг/мл в 50 мкл 1X PBS-0,1% казеина в 96-луночном U-образном планшете Microplate. Конечная концентрация разведенных Fab будет составлять 20 мкг/мл.

5. После 2 часов инкубации с блокирующим раствором планшет промывали 3 раза 300 мкл на лунку 1X PBS-0,05% Tween.

6. С помощью многоканальной пипетки объемом 200 мкл по 50 мкл каждого разведения Fab переносили из разведения планшет в планшет с покрытием.

7. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

8. Через 30 минут в каждую лунку добавляли по 50 мкл биотинилированного клона 7B07 (hFab) в концентрации 400 нг/мл до достижения конечной концентрации 200 нг/мл.

9. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

10. После инкубации планшет промывали 5 раз 300 мкл на лунку 1X PBS-0,05% Tween.

11. Затем детектирование осуществляли с помощью 100 мкл пероксидазы стрептавидина (разведенного в соотношении 1/5000 в 1X PBS-0,1% казеина).

12. Планшет герметично закрывали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре при встряхивании на шейкере-платформе со скоростью 450 об/мин.

13. За 15 минут до окончания времени инкубации ТМБ перемещали в комнатную температуру.

14. По истечении этого времени инкубирования планшет промывали 5 раз по 300 мкл 1X PBS-0,05% Tween на лунку.

15. Наконец, в каждую лунку добавляли по 100 мкл ТМБ. Реакцию проводили в течение 10 минут при встряхивании со скоростью 450 об/мин, затем останавливали добавлением 100 мкл на лунку 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

16. Поглощение измеряли при длине волны 450 нм (эталонная длина волны 620 нм) с помощью прибора Тесан и программного обеспечения Magellan версии № 7.2.

#### Скрининг связывания периплазматического экстракта Fab с помощью OctetRed96

BLI представляет собой безмаркерную технологию измерения биомолекулярных взаимодействий. Это оптический аналитический метод, который анализирует интерференционную картину белого света, отраженного от двух поверхностей: слоя иммобилизованного белка на кончике биосенсора и внутреннего эталонного слоя. Любое изменение количества молекул, связанных с наконечником биосенсора, вызывает сдвиг интерференционной картины, который можно измерить в реальном времени.

Скрининговый анализ BLI Octet использовали для проверки связывающей способности Fab, полученных в виде периплазматического экстракта после этапа селекции.

1. Меченный Gal10-His человека разводили в кинетическом буфере (200 мкг/мл) и захватывали на наконечниках Anti Penta His 1K до достижения уровня захвата 1 нм (этап загрузки, 30 секунд).

2. Периплазматические экстракты разводили 1:5 в кинетическом буфере и наносили на 120 секунд (ассоциация), а затем 120 секунд диссоциации.

3. Регенерацию кончиков проводили путем двухкратного промывания по 10 секунд в глицине, pH 1,5.

4. Для оценки неспецифического связывания периплазматического экстракта с наконечниками сенсоров использовали эталонные наконечники Anti Penta His 1K. Эти кончики были покрыты нерелевантным белком, меченым His (контролем CD70 107B8 сортазы His D3) до уровня 1 нм и инкубировались с периплазматическими экстрактами.

5. Анализ связывания BLI для Gal10-His проводили при температуре 25°C с использованием OctetRed 96 (ForteBio).

6. Был проведен двойной эталонный анализ, привязка к эталонным наконечникам и буферу (на наконечниках с покрытием Gal10-His) были удалены из сигнала, обнаруженного с помощью наконечников с покрытием.

7. Кинетические параметры определяли путем аппроксимации связывания Fab на захваченном Gal10-His с помощью модели связывания 1:1 (выравнивание оси Y по базовой линии, межступенчатая коррекция диссоциации, фильтрация Савицкого Голея, подбор кривой локально/частично) с использованием ForteBio. Программное обеспечение для анализа данных 9.0. Следует обратить внимание, что на каждый РМР использовалась 1 колонка Anti Penta His 1K, которую выбрасывали после 10 циклов регенерации.

#### Характеристика связывания молекул анти-Gal10 на Biacore 3000

##### Покрытие чипа CM5 Gal10-His

Для определения связывающих свойств периплазматических экстрактов сенсорный чип CM5 покрывали 2500-3000 RU Gal10-His.

1. Материал покрытия был забуферен ацетатом с pH 5,5 в концентрации 20 мкг/мл.

2. Затем Gal10-His иммобилизовали на эфирах NHS, активированных на поверхности чипа CM5 реакцией с EDC и NHS.

3. После иммобилизации мишени проводили промывку и дезактивацию свободных эфиров NHS этаноламином.

##### Покрытие чипа CM5 антителом против His-метки

Для определения способности связывания конструкций против Gal10 на Biacore 3000 использовали метод захвата. Для этой цели моноклональную мышиную антигистидиновую метку BioRad, клон AD1.1.10, наносили путем аминного связывания на 4 канала чипа CM5 с конечным откликом 4000 RU.

1. Материал покрытия забуферивали ацетатом с pH 4,5 в концентрации 20 мкг/мл.

2. Моноклональные антитела затем иммобилизовали на эфирах NHS, активированных на поверхности чипа CM5 реакцией с EDC и NHS.

3. После иммобилизации мишени проводили промывку и дезактивацию свободных эфиров NHS этаноламином.

Скрининг связывающих свойств периплазматических экстрактов scFv (внеплановый скрининг)

Для скрининга связывающих свойств периплазматических экстрактов использовали чип, покрытый 2600 RU Gal10-His.

1. Пери, хранившиеся в 96-луночном планшете при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ , размораживали и разводили 1:5, добавляя 10 мкл пери к 40 мкл рабочего буфера HBS EP в новом 96-луночном планшете Viacore с круглым дном. Табличка была запечатана.

2. После цикла праймирования, нормализации и прайминга покрытый чип CM5 уравнивали рабочим буфером с помощью 4 циклов по 10 мкл буфера HBS EP с pH 7,4.

3. Используя скорость потока 5 мкл/мин, вводили 25 мкл разбавленных периплазматических экстрактов.

4. Через 15 минут была проведена регенерация чипа путем введения 6 мкл 8 мМ NaOH (Quickinject со скоростью потока 100 мкл/мин) перед введением нового образца.

5. Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения «BIAevaluation» версии № 4.1.1 с вычитанием 2 1 и 4 3. Буфер сенсорграммы использовался только в качестве эталона, а сигнал удалялся (Y-преобразование). Наконец, использовали подходящую модель для определения аффинности и скорости диссоциации клона к Gal10-His (Fit Kinetics отдельно  $k_a/k_d$ /диссоциация/Ленгмюровская диссоциация).

Скрининг связывающих свойств Fab (скрининг скорости диссоциации)

Для скрининга связывающих свойств периплазматических экстрактов и очищенных анти-Gal10-молекул использовали чип, покрытый 4000 RU анти-His-меточным антителом.

1. Очищенные Fab разводили до нескольких концентраций. В комплект были включены калибраторы и образцы для контроля качества (70%, 100% и 130% тестируемой концентрации).

2. После цикла праймирования, нормализации и прайминга покрытый чип CM5 уравнивали рабочим буфером с помощью 2 циклов по 60 мкл буфера HBS EP с pH 7,4.

3. На первом этапе Gal10-His был захвачен в 1 канале чипа CM5 с покрытием посредством инъекции 20 мкл («Quickinject», скорость потока была установлена на 30 мкл/мин) разбавленного Gal10-His до окончательного захвата. Был достигнут уровень около 500 RU.

4. На втором этапе одно разведение клонов в основной цепи Fab человека вводили в захваченный Gal10-His (2 канала, 60 мкл, «Kinject»).

5. После времени диссоциации, равного 100 секундам, регенерацию чипа осуществляли путем одной инъекции 8 мкл 10 мМ глицина HCl, pH 2,4 («Quickinject»).

6. Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения «BIAevaluation» версии № 4.1.1 с вычитанием Fc4 Fc3 или Fc2 Fc1. Нормализацию сенсорграммы проводили после улавливания уровня Gal10-His (около 200 секунд). В качестве эталона использовался только буфер сенсорграммы, а сигнал удалялся (Y-преобразование/кривая-кривая 2 (вычитание пустого прогона)). Наконец, для определения аффинности и скорости отклонения клона к Gal10-His использовали подгоночную модель с эффектом массопереноса (Fit Kinetics одновременное  $k_a/k_d$ /связывание с массопереносом/локальное Rmax).

### Растворение CLC человека (покадровое изображение)

1. Внешние лунки 96-луночного планшета заполняли 300 мкл буфера PBS.
2. По краям пластины наносили достаточное количество вакуумной смазки во избежание испарения.
3. 2 мкл капле разбавленного раствора CLC (0,7 мг/мл в PBS) наносили на 96-луночный планшет.
4. Далее на пластину надевали прозрачную пластиковую крышку.
5. Затем планшет помещали в 96-луночный держатель планшета конфокального микроскопа с вращающимся диском и определяли две позиции на лунку.
6. После того, как все положения были выбраны, планшет вынимали из держателя, снимали крышку и к 2 мкл капли CLC в лунке добавляли 2 мкл раствора антител. В качестве контроля добавляли 2 мкл буфера PBS.
7. Для обеспечения воспроизводимости каждое состояние Fab визуализировалось несколько раз.
8. Затем планшет герметически закрывали и помещали обратно в держатель микроскопа. Кроме того, пластину фиксировали клейкой лентой, чтобы исключить смещение столика. Затем все позиции перепроверяли и уточняли. Позиции сохраняли в метаданных, выдаваемых программным обеспечением.
9. Затем каждые 3,5 минуты образцы визуализировали на аппарате Axio Observer.Z1 (Zeiss), оснащенном вращающейся дисковой головкой CSU X1 Yokogawa (Yokogawa Corporation) и Zeiss AxioCam Mrm (Zeiss), с сухим объективом Plan ApoChromat 10x (NA 0.30, DIC). Изображения получали непрерывно в течение 3 часов (весь цикл занимает примерно 72 секунды).
10. Реконструкцию изображения и анализ данных выполняли с помощью ImageJ (NIH). Короче говоря, для каждого стека создавали суммарные проекции, затем к изображениям применяли фильтр границ, после чего можно было применить порог. На каждом изображении были проведены измерения для расчета общей площади, занимаемой кристаллами, а затем данные были экспортированы в файл Excel, где они были нормализованы к нулевой точке времени и построены в виде функции времени. Данные повторных образцов объединяли для статистического анализа. Общий размер CLC измерялся с течением времени и отображался в GraphPad Prism 7.01. Значения EC50 (50% растворение) и EC10 (90% растворение) для каждого антитела рассчитывали с помощью нелинейной регрессии (логарифм (агонист) в зависимости от ответа, переменный наклон (четыре параметра)).

### Растворение CLC человека (покадровое изображение)

1. Цель состояла в том, чтобы определить активность 14 фрагментов антител в 1536-луночном анализе высокого содержания в присутствии 1 мкг Gal10 на лунку.
2. 3,8 мг/мл Gal10 инкубировали в течение ночи (16 часов) при температуре 20°C в пробирке объемом 1,5 мл с 38 мкг/мл TEV-протеазы.

3. 4 мг/мл Gal10 перемешивали на вортексе в течение 30 секунд и разбавляли до концентрации 0,2 мг/мл в PBS через 30 минут после встряхивания.

4. Контрольные образцы анализа добавляли в 1536-луночный планшет: готовили 10-точечные серийные разведения 1D11 и вручную добавляли 1 мкл (n=3) в 1536-луночный планшет. Добавляли 1 мкл PBS и 1D11 (3 мг/мл) (n=64).

5. Антитела разводили до 1,5 мг/мл и 1 мкл переносили (n=4) в 1536-луночный планшет.

6. 5 мкл Gal10 (всего 1 мкг) распределяли с помощью дозатора (BioTek MultiFlo) на антитело в планшете.

7. Планшет визуализировали (InCell 2200) через 2, 5, 7 и 16 часов после добавления антитела.

Изображения были сегментированы с использованием разработанного нами алгоритма для обнаружения отдельных кристаллов и расчета общей площади кристаллов на лунку.

### **Пример 5: Результаты дальнейшего исследования устойчивости к температурным стрессам**

Все клоны хранили при температуре 2-8°C в течение 48 часов, а концентрацию белка в образце доводили до 10 мг/мл в исходном буфере для приготовления препарата в асептических условиях.

Затем клоны хранили при различных температурных условиях (+5°C, +25°C и +37°C) в течение 4 недель (4W) и исследовали на стабильность с недельными интервалами. Стабильность исследовали после нескольких циклов замораживания-оттаивания (1x, 5x и 10x циклов) и после термического стресса (термотолерантность) в диапазоне температур денатурации, охватывающем диапазон от температуры 55°C до 80°C.

#### **2.1 Результаты исследования устойчивости к температурным стрессам**

##### **Внешний вид и визуальный осмотр**

Два человека проводили визуальную проверку стабильности образцов во все моменты времени и при всех температурных стрессовых условиях (0,5 мл заполняют 1,5 мл в прозрачных стеклянных флаконах). В целом образцы имели одинаковый внешний вид (таблица 31).

Клон	Начало исследования	Хранение при +5°C в течение 4W			Хранение при +25°C в течение 4W			Хранение при температуре +37°C в течение 4W		
		T1 W	T2W	T4W	T1 W	T2W	T4W	T1 W	T2 W	T4 W
18C06	A/A	A/A	AF/A	A/A F	B/A	B/A	A/B	B/B	B/A	A/B

<b>20H09</b>	A/A	A/ A	AF/A F	A/A F	A/ A	A/A	A/A	B/B	B/A	A/B
<b>23H09</b>	A/A	A/ A	B/A	A/B	A/ A	AF/ A	A/B	A/B	B/A	A/B
<b>24F02_N53 A</b>	A/A	A/ A	A/A	A/A	A/ A	A/A	B/AF	A/ A	A/ A	B/A

A: видимых частиц нет; B: мало видимых частиц (~5); F: волокна

Таблица 31: Обзор результатов визуального осмотра клонов после температурного стресс-теста.

#### Мутность

Для качественного обнаружения рассеяния и агрегации частицы оценивали путем регистрации спектров поглощения на спектрофотометре на двух длинах волн. Результаты выражали в виде индекса агрегации (AI) при 340 нм и 500 нм для всех образцов.

A.I. определяли по следующим формулам:

$$A.I._{340\text{нм}} = A_{340\text{нм}} / (A_{280\text{нм}} - A_{340\text{нм}}) \text{ и } A.I._{500\text{нм}} = A_{500\text{нм}} / (A_{280\text{нм}} - A_{500\text{нм}}).$$

Для каждого образца соответствующий буфер, отрицательный контроль (стерильная, отфильтрованная вода mQ) и положительный контроль (образец белка, о котором известно, что он содержит повышенные агрегаты) также подвергались одному и тому же спектрофотометрическому анализу. Никаких явных различий не наблюдалось между клонами с точки зрения индексов агрегации по сравнению с буфером препарата или между клонами для любого из примененных условий температурного стресса (таблица 32).

A.I. 340нм	Хранение при +5°C в течение 4 недель			Хранение при +25°C при 4W			Хранение при температуре +37°C при 4W		
	T1 W	T2 W	T4 W	T1 W	T2 W	T4 W	T1 W	T2 W	T4 W
<b>Буферная смесь</b>	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
<b>18C06</b>	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
<b>20H09</b>	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
<b>23H09</b>	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
<b>Положительный контроль</b>	0,07	0,09	0,10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Отрицательный контроль</b>	0,03	0,03	0,03	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Буферная смесь</b>	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
<b>24F02_N53A</b>	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03



<b>Положительный контроль</b>	0,09	0,09	0,09	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Отрицательный контроль</b>	0,04	0,04	0,04	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>А.І. 500нм</b>									
	<b>Хранение при +5°C в течение 4 недель</b>			<b>Хранение при +25°C при 4W</b>			<b>Хранение при температуре +37°C при 4W</b>		
	<b>T1 W</b>	<b>T2 W</b>	<b>T4 W</b>	<b>T1 W</b>	<b>T2 W</b>	<b>T4 W</b>	<b>T1 W</b>	<b>T2 W</b>	<b>T4 W</b>
<b>Буферная смесь</b>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
<b>18C06</b>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
<b>20H09</b>	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01
<b>23H09</b>	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
<b>Положительный контроль</b>	0,04	0,04	0,05	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Отрицательный контроль</b>	0,01	0,01	0,01	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Буферная смесь</b>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
<b>24F02_N53A</b>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
<b>Положительный контроль</b>	0,04	0,04	0,04	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Отрицательный контроль</b>	0,01	0,01	0,01	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND=не определено.

Таблица 32. Показатели мутности и агрегации А.І. 340 и А.І. 500нм, полученная для клонов на протяжении всего исследования в условиях различных температурных стрессов.

Обнаружение субмикронных частиц методом динамического рассеяния света (DLS)

DLS-анализ проводился для всех клонов и образцов составов на 4-недельной стадии исследования (Т4W) для всех условий хранения. Измерения проводились на трехкратных препаратах с помощью прибора DynaPro Nanostart. Контрольные образцы без какой-либо нагрузки, образцы, выдержанные в течение 4 недель (4W) в различных стрессовых условиях (при T0 и в течение T4W), анализировались прямым сравнительным исследованием. Для мониторинга профилей распределения субмикронных частиц в растворе использовали процент массы, гидродинамический радиус молекулы, процент полидисперсности (%PD) и индекс полидисперсии (PDI).

Буферы состава не подходили ни для каких условий хранения, ни до, ни после фильтрации (0,2 мкм). Аликвоты, хранившиеся в течение 4W (Т4W) при +25°C и +37°C, не подходили ни для одного из кандидатов. Кроме того, растворы для клонов 20Н09 и 23Н09 не подходили для не подвергавшихся стрессу образцов в начале исследования (Т0). Таким образом, все образцы для всех 4 кандидатов были отфильтрованы и повторно проанализированы (тройные измерения). Профили DLS при Т4W для образцов были относительно схожими и имели несколько пиков интенсивности, но количество немонотонных частиц в целом было незначительным, как показывают массовые проценты (таблица 33). Радиус основного пика для всех кандидатов соответствовал ожидаемому размеру белков. Полидисперсность образца является показателем однородности. Хотя полидисперсность была различной в разных повторностях для каждого из клонов, в целом показатели полидисперсности указывали на узкое распределение частиц по размерам во всех образцах. Большинство протестированных постфильтрационных проб при различных условиях хранения оказались мультимодальными, что указывает на наличие в пробах частиц разного размера. Образцы из клона 24F02-N53A были наименее склонны к мультимодальному рассеянию, что указывает на то, что эти образцы имели более узкое распределение частиц по размерам.

Образцы	Радиус (нм)	Диапазон радиуса (нм)	Масса (%)	Диапазон массы (%)	PD (%)	Диапазон PD (%)	PDI	Диапазон PDI	Число мультимодальных образцов	Число неподходящих образцов
<b>g18C06 T0</b>	3,3	3,2-3,5	100	100	11,8	11,0-12,7	0,12	0,11-0,13	1/3	0/3
<b>g18C06 T4W +5°C</b>	3,1	3,0-3,2	100	100	11,8	6,6-19,5	0,12	0,07-0,19	0/3	0/3
<b>g18C06 T4W +25°C</b>	3,2	3,2-3,3	100	100	12,0	7,1-15,7	0,12	0,07-0,16	2/3	0/3
<b>g18C06 T4W +37°C</b>	3,2	3,1-3,2	100	100	9,1	5,7-11,6	0,09	0,06-0,12	3/3	0/3
<b>g20H09 T0</b>	3,7	3,6-3,9	99,9	99,9-100	13,2	11,3-14,6	0,13	0,11-0,15	3/3	0/3
<b>g20H09 T4W +5°C</b>	3,5	3,4-3,5	100	100	12,4	11,8-13,4	0,12	0,12-0,13	0/3	0/3
<b>g20H09 T4W +25°C</b>	3,5	3,5	100	100	12,6	11,9-14,0	0,13	0,12-0,14	3/3	0/3
<b>g20H09 T4W +37°C</b>	3,8	3,7-3,9	99,9	99,9	21,4	17,5-23,5	0,21	0,18-0,23	3/3	0/3
<b>g23H09 T0</b>	3,5	3,4-3,7	100	100	11,3	10,4-11,9	0,11	0,10-0,12	3/3	0/3
<b>g23H09 T4W +5°C</b>	3,3	3,2-3,3	100	99,8-100	11,1	9,8-18,2	0,11	0,10-0,18	1/3	0/3
<b>g23H09 T4W +25°C</b>	3,6	3,6	100	99,9-100	14,1	11,5-15,5	0,14	0,12-0,15	3/3	0/3

<b>g23H09 T4W +37°C</b>	3,6	3,6	100	99,9-100	16,0	14,3-8,2	0,16	0,14-0,18	3/3	0/3
<b>g7B07_N53A T0</b>	3,4	3,3-3,5	100	100	11,9	11,8-12	0,12	0,12	0/3	0/3
<b>g7B07_N53A T4W +5°C</b>	3,3	3,2-3,4	100	100	11,1	10,6-11,6	0,11	0,11-0,12	0/3	0/3
<b>g7B07_N53A T4W +25°C</b>	3,3	3,2-3,3	100	100	11,1	10,1-13,2	0,11	0,10-0,13	3/3	0/3
<b>g7B07_N53A T4W +37°C</b>	3,2	3,2-3,3	100	100	10,9	9,6-13,2	0,11	0,10-0,13	3/3	0/3
<b>g24F02_N53A T0</b>	3,5	3,4-3,5	100	100	12,2	11,9-12,7	0,12	0,12-0,13	0/3	0/3
<b>g24F02_N53A T4W +5°C</b>	3,5	3,5	100	100	16,4	11,9-20,0	0,16	0,12-0,20	0/3	0/3
<b>g24F02_N53A T4W +25°C</b>	3,5	3,5	100	100	17,7	14,6-19,5	0,18	0,15-0,19	0/3	0/3
<b>g24F02_N53A T4W +37°C</b>	3,6	3,5-3,6	100	100	16,6	12,1-19,6	0,17	0,12-0,20	0/3	0/3
<b>Буфер T4W +5°C</b>	Не подходящий									3/3
<b>Буфер T4W +25°C</b>	Не подходящий									3/3

<b>Буфер</b> <b>T4W +37°C</b>	Не подходящий	3/3
----------------------------------	---------------	-----

Таблица 33: Сводка DLS данных

### Концентрация белка

Концентрацию белка оценивали при A280 нм (Nanodrop) для образцов, подвергшихся температурному стрессу, а также образцов, подвергшихся стрессу при замораживании-оттаивании (фигура 3). В целом, никаких потерь белка не наблюдалось ни для одного из клонов, протестированных при любой температуре хранения.

Для клона 18C06, хранившегося при температуре +37°C в течение 4W, результат был нетипичным. Однако анализ независимой аликвоты, которая была сохранена в качестве резервной пробы (в тех же условиях эксперимента), тем не менее, был измерен в пределах ожидаемого диапазона.

### Связывающая активность по SPR

Затем функционально-активную концентрацию кандидатов оценивали методом SPR на приборе Biacore 3000 (фигура 4). Все образцы оценивали методами, отвечающими стандартным квалификационным критериям. Аликвоты исследовали при заранее заданных тестовых концентрациях по кривым титрования эталонных образцов (T0, хранение при температуре -80°C) и в присутствии образцов контроля качества (QC), охватывающих диапазон 70-130% относительной активности (%RA) по отношению к эталонному материалу.

Почти все подвергшиеся температурному стрессу образцы из четырех клонов-кандидатов сохраняли относительную активность более 90% независимо от условий их хранения (фигура 4). Аналогичные наблюдения были сделаны с образцами, подвергнутыми циклам замораживания-оттаивания и низкому pH (фигура 4). Единственный зарегистрированный атипичный результат был для клона 18C06, хранившегося в течение 4 недель при температуре +37°C, хотя при исследовании независимой аликвоты того же образца, с которой обращались в тех же условиях, наблюдалось сохранение более 90% RA (фигура 4).

### Чистота размера по SE-HPLC

Чистоту методом SE-HPLC оценивали с помощью хроматографической системы Agilent 1260 Infinity II, оснащенной четверным насосом, автоматическим инжектором, онлайн-дегазатором и детектором DAD, термостатируемым отсеком колонки (21°C) и автоматическим пробоотборником, установленным на температуру 6°C. Детектор был установлен на длины волн 280 нм и 214 нм одновременно для мониторинга вариантов размера. Образцы анализировали при всех условиях хранения и во все моменты времени.

Было обнаружено, что все образцы из четырех клонов, подвергнутые температурному стрессу, замораживанию-оттаиванию и низкому pH, имели чистоту более 95% (фигура 5). Процент агрегации и фрагментации оставался ниже 1% для большинства образцов, подвергшихся температурному стрессу (фигура 5). Единственным исключением были образцы клона 23H09, которые демонстрировали вызванное температурой увеличение образования агрегатов (фигура 5).

Образцы, подвергнутые до 10 циклам замораживания-оттаивания, демонстрировали чистоту, сравнимую с эталонным материалом для всех клонов (фигура 5). Для образцов,

подвергшихся воздействию стрессора с низким рН, незначительная агрегация была обнаружена в образцах клона 23H09 (фигура 5). Все остальные исследованные клоны продемонстрировали некоторую фрагментацию после воздействия стресса с низким рН (фигура 5). Однако во всех случаях процент примесей оставался ниже 5% (фигура 5).

#### Чистота методом капиллярного гель-электрофореза (сGE)

Чистоту по сGE оценивали с помощью лабораторного анализа с использованием устройства Expert 2100 Bioanalyzer (Agilent). Образцы анализировали в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях в конечный момент времени каждого исследования.

Различные условия хранения не повлияли на чистоту клонов, за исключением клона 18C06 (фигура 6). Образцы, содержащие этот клон, не демонстрировали чистоту основного пика более 90% в невосстанавливающих условиях (фигура 6). То же самое произошло и с не подвергавшегося стрессу эталонным образцом, содержащим клон 18C06 (фигура 6). Для остальных образцов, содержащих остальные три клон, чистота превышала 90% в невосстанавливающих условиях независимо от температуры хранения, момента времени анализа или количества циклов замораживания-оттаивания, которым они подвергались (до 10) (фигура 6). В восстановительных условиях все протестированные образцы продемонстрировали чистоту более 95% (фигура 6).

#### Термотолерантность

Чтобы оценить термостабильность кандидатов, клоны подвергали тесту на разложение при градиентной температуре, охватывающему температурный диапазон 55-85°C. После приложения этого стресса в термоциклере Biometra, запрограммированном на применение нескольких денатурирующих температур, связывающую активность подвергнутых стрессу образцов оценивали на Biacore 3000, чтобы определить температуру, при которой 50% связывающая активность по отношению к Gal10 прекращалась. 100%-ную активность связывания приписывали не подвергавшегося стрессу образцу каждого клон, который затем параллельно анализировали с помощью SPR. Образцы всех клонов продемонстрировали потерю активности на 50% при повышенных температурах (таблица 34). Наиболее стабильным клоном, идентифицированным с помощью этого аналитического подхода, был кандидат 24F02\_N53A, который, наряду с эталонным клоном 7B07\_N53A, демонстрировал температуру плавления выше 70°C.

<b>Диапазон температур разложения</b>	<b>Клон</b>	<b>Потеря связывающей активности на 50% из-за SPR (°C) (°C)</b>
55-75°C	18C06	65,4
55-75°C	20H09	66,3
55-75°C	23H09	67,5
65-85°C	24F02_N53A	74,7
58-80°C	7B07_N53A	72,9

Таблица 34: Обзор термической стабильности ведущих кандидатов

#### Сводные таблицы

Сводная таблица, иллюстрирующая несколько основных характеристик выбранных Fab (до приложения какого-либо типа нагрузки), представлена в таблице 35. Fab 7B07\_N53A включен для сравнения и справочных целей.

Табличная сводка характеристик выбранных Fab в различных условиях представлена в таблице 36. Сводная таблица, иллюстрирующая несколько физико-химических характеристик отдельных кандидатов после замораживания-оттаивания, низкого рН и термического стресса, представлена в таблицах 37-40.



Свойство	Критерии (цель)	g18C06	g20H09	g23H09	g24F02_N53A	(g7B07_N53A)*
Формат	Fab	Fab	Fab	Fab	Fab	Fab
Человеческая идентичность	% идентичности V-области человеческого зародыша	100%	98,8%	98,8%	100%	98,8%
Иммуногенность	Оценка по эপিбазе: человек	Человек	Человек	Человек	Человек	NT
	Оценка иммуногенности: низкая (L)	Низкая	Низкая	Низкая	Низкая	
Перекрестная реактивность	Перекрестная реактивность Суно	Нет	Нет	Да	Да	Нет
Связывающая активность	KD (аффинность) ≤15 нМ	Да (1,3 нМ)	Нет (17,7 нМ)	Да (5,3 нМ)	Да (1,4 нМ)	Нет (145,0 нМ)
	kd (скорость диссоциации) ≤5E-03/с	Да (4,9E-04/с)	Нет (4,7E-02/с)	Да (3,1E-03/с)	Да (1,8E-03/с)	Нет (79,0E-03/с)
pI	Отчет о результатах	9,55	8,32	7,47	8,03	NT

NT: не исследовалось; L: низкий показатель иммуногенности

Таблица 35: Обзор свойств ведущих кандидатов на Fab

Таблица 36: Обзор свойств четырех клонов Fab после нескольких стрессов: связывающая активность, биологическая активность по CLC, чистота по CE-SDS (в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях) и SE-HPLC, посттрансляционные модификации и оценка частиц по DLS и FCM

Свойство	Критерии (цель)	g18C06	g20H09	g23H09	g24F02_N53A	(g7B07_N53A) *

<b>Связывающая активность</b>	Стрессовый <sup>(1)</sup> /распыленный <sup>(2)</sup> (<20%-ная потеря относительной активности по SPR)	Нет (?)/Нет 82% (93%) <sup>3</sup> /101%	Нет/Нет 101%/97%	Нет/Нет 93%/119%	Нет/Нет 103%/111%	Нет/Нет 95%/94%
<b>Биологическая активность (растворение кристаллов recGal10)</b>	Не подвергавшийся стрессу материал (T0) Стрессовый <sup>(1)</sup> /распыленный <sup>(2)</sup> Отчет о результатах EC50 (мкг/мл; T2h)	Анализ 1: 281 Анализ 1: 232/485 Анализ 2: NA	Анализ 1: 260 Анализ 1: 272/395 Анализ 2: NA	Анализ 1: 252 Анализ 2: 190 Анализ 1: 361/297 Анализ 2: 191/209	Анализ 1: NA Анализ 2: 191 Анализ 1: NA Анализ 2: 164/159	Анализ 1: 309 Анализ 1: 379/584 Анализ 2: NA
	Стрессовый <sup>(1)</sup> /распыленный <sup>(2)</sup> % относительной активности по отношению к эталонному T0 после 2 ч инкубации (<20%-ная потеря относительной активности)	Нет/Да 121%/58%	Нет/Да 96%/66%	Нет/Нет (Анализ 2) 100%/91%	Нет/Нет 117%/120%	Нет/Да 82%/53%

<b>Чистота (SE-HPLC/CE-SDS)</b>	Стрессовый/распыленный, все условия ( $\geq 90\%$ основной, $\leq 10\%$ HMW и LMW)	SE-HPLC: Да CE-SDS: ~87% мономера	Да	Да	Да	Да
	Стрессовый/распыленный, все условия ( $\Delta T_0 \leq 5\%$ , $\Delta \text{HMW} < 2\%$ post-neb)	Да	Да	Да (Т-индуцированный : 3,3% HMW sp; низкий pH: 1,7% HMW sp)	Да	Да
<b>Посттрансляционные модификации</b>	Основные требования к Т-стрессовым образцам, все условия	незначительный; точка доступа в LC	незначительный	незначительный	незначительный	незначительный
	Основные требования к распыленным все условия/низкий pH	Нет	Нет	Нет	Нет/(незначительный в LC_CDR)	Нет
<b>Невидимые частицы (DLS после фильтрации)</b>	Стрессовый, все условия (T4W)	Немономерные образцы незначительны	Немономерные образцы незначительны ( $< 0,1\%$ ) <sup>(4)</sup>	Немономерные образцы незначительны ( $< 0,2\%$ ) <sup>(4)</sup>	Немономерные образцы незначительны	Немономерные образцы незначительны

	Распыленный (T0 и T4W) PDI Диапазон (T4W) до-/после-распыления	Немономерные образцы незначительны (<0,1%) PDI: 0,13/0,06-0,13	Не подходящий PDI: 0,13/NA	Не подходящий PDI: 0,16/NA	Немономерные образцы незначительны (<0,1%) PDI: 0,16/0,12-0,14	Немономерные образцы незначительны PDI: 0,12/0,11-0,16
<b>Невидимые частицы (FCM)</b>	<b>Общее количество отсчетов/мл (&lt;30000 отсчеты/мл)</b> T0 (до-/после-распыления) T4W (до-/после-распыления)	6,547/16,201 266/23,363	1,476/212,723 14,063/291,462	302/241,257 854/292,352	2,456/21,550 2,606/19,713	NA/NA 1,827/12,104
	<b>&gt;2 мкм/мл (&lt;10,000 отсчеты/мл)</b> T0 (до-/после-распыления) T4W (до-/после-распыления)	559/2,204 137/3,992	292/28,532 1,576/49,344	139/31,724 397/32,911	642/4,732 442/4,328	NA/NA 802/3,118

\* сравнение/эталон

<sup>1</sup> образцы соответствуют аликвотам, хранившимся при температуре +37°C в течение 4 недель

<sup>2</sup> образцы соответствуют аликвотам, хранившимся при температуре +5°C в течение 4 недель перед распылением. Вкратце, образцы распылялись с помощью активного вибрационного сетчатого распылителя Aerogen Solo, который превращал раствор лекарственного

средства во вдыхаемый аэрозоль. Для каждого клона использовали три разных устройства для каждого момента времени, и результаты сообщались по серийному номеру устройства (распылителя). В случае загрязнения устройства, о чем свидетельствует более длительное время распыления, чем обычно, для данного размера аликвоты, были доступны запасные устройства того же типа для завершения распыления с помощью устройств в трех экземплярах

<sup>3</sup> %RA RA для этого образца после 4 недель хранения при температуре +37°C было измерено на уровне 82% (эппендорф) и 93% (стеклянный флакон) для двух независимых образцов

<sup>4</sup> образцы для 20H09 и 23H09 не подходили без фильтрации даже для не подвергавшихся стрессу аликвот; информация в этой строке иллюстрирует результаты после фильтрации для всех клонов всех типов образцов

Способ	Устойчивость к замораживанию/оттаиванию			Стресс-тест с низким уровнем pH <sup>(1)</sup>		Термо толерантность
	1 F/T	(5 F/T) <sup>(2)</sup>	10 F/T	До стресса с низким pH	После стресса при низком pH	
						50%-ная достигнутая относительная активность по Viacore (°C)
Концентрация белка (мг/мл)	10,3	NT	10,1	NA	NA	NA
Значение pH				7,43	3,70	
Эффективность по Viacore (% относительной активности по отношению к эталону)	106%	NT	109%	91%	92%	65,4

<b>CE-SDS в восстанавливающих условиях Отчет % всего Fab</b>	98,6%	NT	97,8%	NA	NA	NA
<b>CE-SDS в невосстанавливающих условиях % основного пика</b>	88,0%	NT	90,8%	NA	NA	NA
<b>Размеры вариантов SE- HPLC % мономера</b>	100%	NT	100%	100%	97,5%	NA
<b>% агрегатов</b>	ND	NT	ND	ND	0,2%	NA
<b>% деградации</b>	ND	NT	ND	ND	2,4%	NA

(1) Стресс-тест с низким уровнем pH достигался путем установления pH 3,7 с помощью 0,1 М глицина pH 3,0, и после 2-часовой стадии выдерживания в условиях окружающей среды аликвоту снова нейтрализовали с помощью 1М Tris pH8,0.

(2) Одну аликвоту подвергли 5 циклам замораживания-оттаивания, но в соответствии с протоколом ее не анализировали, поскольку для 10 аликвот замораживания-оттаивания не было получено атипичных результатов.

NT: не исследовалось; NA: неприемлемый; ND: не обнаружен

Таблица 37: Обзор некоторых физико-химических характеристик Fab-клона 18C06.

<b>Способ</b>	<b>Устойчивость к замораживанию/оттаиванию</b>	<b>Стресс-тест с низким уровнем pH <sup>(1)</sup></b>	<b>Термо толерантность</b>
---------------	--	---	--------------------------------

	1 F/T	(5 F/T) <sup>(2)</sup>	10 F/T	До стресса с низким рН	После стресса с низким рН	50%-ная достигнутая относительная активность по Biacore (°C)
<b>Концентрация белка (мг/мл)</b>	11,0	NT	10,7	NA	NA	NA
<b>Значение рН</b>				7,49	3,73	
<b>Эффективность по Biacore (% относительной активности по отношению к эталону)</b>	104%	NT	110%	105%	103%	66,3
<b>CE-SDS в восстанавливающих условиях Отчет % всего Fab</b>	95,4%	NT	95,7%	NA	NA	NA
<b>CE-SDS в невосстанавливающих условиях % основного пика</b>	97,4%	NT	97,2%	NA	NA	NA

<b>Размеры вариантов SE-HPLC</b>						
<b>% мономера</b>	100%	NT	100%	100%	96,3%	NA
<b>% агрегатов</b>	ND	NT	ND	ND	ND	NA
<b>% деградации</b>	ND	NT	ND	ND	3,7%	NA

<sup>(1)</sup> Стресс-тест с низким уровнем pH достигался путем установления pH 3,7 с помощью 0,1 М глицина pH 3,0, и после 2-часовой стадии выдерживания в условиях окружающей среды аликвоту снова нейтрализовали с помощью 1М Tris pH8,0. <sup>(2)</sup> Одну аликвоту подвергли 5 циклам замораживания-оттаивания, но в соответствии с протоколом ее не анализировали, поскольку для 10 аликвот замораживания-оттаивания не было получено атипичных результатов.

NT: не исследовалось; NA: неприемлемый; ND: не обнаружен

Таблица 38: Обзор некоторых физико-химических характеристик Fab-клона 20H09.

<b>Способ</b>	<b>Устойчивость к замораживанию/оттаиванию</b>			<b>Стресс-тест с низким уровнем pH<sup>(1)</sup></b>		<b>Термо толерантность</b>
	<b>1 F/T</b>	<b>(5 F/T)<sup>(2)</sup></b>	<b>10 F/T</b>	<b>До стресса с низким pH</b>	<b>После стресса с низким pH</b>	<b>Относительная активность 50%, достигнутая по Viacore (°C)</b>
<b>Концентрация белка (мг/мл)</b>	10,8	NT	10,6	5,7	2,9	NA
<b>Значение pH</b>				7,50	3,71	



<b>Эффективность по Viacore</b> (% относительной активности по отношению к эталону)	105%	NT	89%	107%	112%	67,5
<b>CE-SDS в восстанавливающих условиях</b> Отчет % всего Fab	96,8%	NT	96,5%	NA	NA	NA
<b>CE-SDS в невосстанавливающих условиях</b> % основного пика	95,6%	NT	95,7%	NA	NA	NA
<b>Размеры вариантов по GP-HPLC</b>						
% мономера	99,4%	NT	99,4%	99,4%	98,3%	NA
% агрегатов	0,6%	NT	0,6%	0,6%	1,7%	NA
% дегградации	ND	NT	ND	ND	ND	NA

(1) Стресс-тест с низким уровнем pH достигался путем установления pH 3,7 с помощью 0,1 М глицина pH 3,0, и после 2-часовой стадии выдерживания в условиях окружающей среды аликвоту снова нейтрализовали с помощью 1M Tris pH8,0.

(2) Одну аликвоту подвергли 5 циклам замораживания-оттаивания, но в соответствии с протоколом ее не анализировали, поскольку для 10 аликвот замораживания-оттаивания не было получено атипичных результатов.

NT: не исследовалось; NA: неприемлемый; ND: не обнаружен

Таблица 39: Обзор некоторых физико-химических характеристик Fab-клона 23H09.

Способ	Устойчивость к замораживанию/оттаиванию			Стресс-тест с низким уровнем pH <sup>(1)</sup>		Термо толерантность
	1 F/T	(5 F/T) <sup>(2)</sup>	10 F/T	До стресса с низким pH	После стресса с низким pH	
						50%-ная достигнутая относительная активность по Biacore (°C)
Концентрация белка (мг/мл)	9,6	NT	9,7	NA	NA	NA
Значение pH				7,43	3,46	
Эффективность по Biacore (% относительной активности по отношению к эталону)	105%	NT	106%	107%	106%	74,7
CE-SDS в восстанавливающих условиях Отчет % всего Fab	96,5%	NT	96,7%	NA	NA	NA
CE-SDS в невосстанавливающих условиях % основного пика	97,1%	NT	93,5%	NA	NA	NA

<b>Размеры вариантов по GP-HPLC</b>						
<b>% мономера</b>	99,7%	NT	99,4%	99,8%	96,1%	NA
<b>% агрегатов</b>	0,3%	NT	0,6%	0,2%	0,1%	NA
<b>% деградации</b>	ND	NT	ND	ND	3,8%	NA

(1) Стресс-тест с низким уровнем pH достигался путем установления pH 3,7 с помощью 0,1 М глицина pH 3,0, и после 2-часовой стадии выдерживания в условиях окружающей среды аликвоту снова нейтрализовали с помощью 1М Tris pH8,0.

(2) Одну аликвоту подвергли 5 циклам замораживания-оттаивания, но в соответствии с протоколом ее не анализировали, поскольку для 10 аликвот замораживания-оттаивания не было получено атипичных результатов.

NT: не исследовалось; NA: неприемлемый; ND: не обнаружен

Таблица 40: Обзор некоторых физико-химических характеристик Fab-клона 24F02\_N53A.

### **Пример 6: Анализ посттрансляционной модификации (PTM)**

Структурную характеристику клонов проводили на уровне белков и пептидов с использованием нескольких аналитических методов (iCIEF, МС с онлайн-обессоливанием, RPLC-UV-MS на восстановленном белке, пептидная карта с использованием RPLC-MS после расщепления трипсином). Клоны анализировали на PTM после того, как они были подвергнуты нескольким стрессовым условиям, включая хранение в течение 4W при различных температурах (+5°C, +25°C, +37°C), распыление до (T0) и после 4-часового хранения при +5°C, а также после стадии выдержки при низком pH (2 ч/pH 3,7). Во всех случаях анализы проводились параллельно с контрольным не подвергавшимся стрессу эталонным материалом для каждого клона.

Выводы можно резюмировать следующим образом:

Аминокислотная последовательность четырех клонов была подтверждена на уровне белка, исходя из молекулярной массы каждого интактного Fab (LC и VH+CH1), тогда как покрытие пептидной последовательности составляло 100%.

Структурная целостность Fab до и после стресса оставалась неизменной и была подтверждена анализами картирования интактных белков и пептидов, которые продемонстрировали и подтвердили наличие (меж- и внутрицепочечных) ожидаемых дисульфидных мостиков. Только 18C06 (все образцы, включая контрольный) был обнаружен со свободным цистеином в LC вместо ожидаемого мостика с частью VH+CH1 и вместо этого обнаружено альтернативное образование дисульфидного мостика между двумя близко расположенными цистеинами в LC.

N-концевая циклизация была обнаружена для общей части VH+CH1 стрессовых клонов, которая была явно индуцирована температурой с общим увеличением содержания пироглутаминовой кислоты после хранения при температуре +37°C (8,5-10,5%) и присутствовала, но менее выражена после хранения при +25°C (2,0-3,5%); эта модификация в VH+CH1 не была идентифицирована для образцов с низким pH или для распыленных образцов. Кроме того, для g18C06 было обнаружено, что после распыления LC является полностью циклическим.

Окисление для всех различных стрессовых условий оставалось <1% для всех клонов.

Сайт-специфичные события, такие как изомеризация и дезамидирование, в целом оставались неизменными после этапа стресса с низким pH или распыления для всех клонов.

Для температурно-стрессовых образцов клон 18C06 продемонстрировал термочувствительное пятно дезамидирования в одном переменном участке LC-цепи (14,7% через 4 недели при температуре +37°C). Два умеренных пятна дезамидирования были обнаружены (до 5% каждое) при повышенной температуре на пептиде VH+CH1, общем для всех пред-лидерных кандидатов. При изомеризации обнаружено одно пятно LC цепи с некоторым ограниченным увеличением изомеризации для g20H09, g23H09 и меньшим для g24F02. Второй пептид в LC, общий для всех конструкций, также ассоциировался с незначительным увеличением изомеризации (до 1,3%).

Свойство	Расположение последовательности	g18C06	g20H09	g23H09	g24F02_N53A
EVQLLESGGGLVQPGGSLR (SEQ ID NO: 66)	VH+CH1 (001-19)	10,5% пироглутамат	8,5% пироглутамат	8,9% пироглутамат	8,5% пироглутамат
NTRYLQMNSLR (SEQ ID NO: 67)	VH+CH1 (072-087)	4,6% дезамидирование (T0: 1,8%)	2,5% дезамидирование (T0: 1,6%)	4,0% дезамидирование (T0: 1,6%)	4,4% дезамидирование (T0: 3,7%)
DYFPEPVTVSWNSGALTS SG VHTFPAVLQSSGLYSLSS VVT VPSSSLGTQTYICNVNHK PS NTK (SEQ ID NO: 68)	VH+CH1 (147-209)	5,3% дезамидирование (T0: 1,0%)	4,8% дезамидирование (T0: 0,8%)	3,7% дезамидирование (T0: 1,2%)	5,1% дезамидирование (T0: 1,6%)
ITCDGNNIGSK <sup>1</sup> (SEQ ID NO: 69)	LC (020-030) <sup>2</sup>		3,7% изомеризация (T0: 1,4%)	2,5% изомеризация (T0: 1,3%)	1,9% изомеризация (T0: 2,0%)
LLIYNANNR (SEQ ID NO: 70)	LC (048-056)	14,7% дезамидирование (T0: 1,0%)			

AQAGDEADYYC <b>QVWDGSAAVFGGGTQL</b> TVLGQPK (SEQ ID NO: 71)	LC (077-110)		1,2% изомеризация (T0: 0,7%)	0,6% изомеризация (T0: 0,5%)	1,8% изомеризация (T0: 1,6%)
ADSSPVK (SEQ ID NO: 72)	LC (150-161)	1,2% изомеризация (T0: 0,1%)	1,2% изомеризация (T0: 0,2%)	1,4% изомеризация (T0: 0,1%)	1,3% изомеризация (T0: 0,2%)

<sup>1</sup> Жирными буквами обозначены области CDR.

<sup>2</sup> клон 18C06 содержит иную LC, чем клоны 20H09, 23H09 и 24F2\_N53A, которые имеют общую LC.

Таблица 41: Основные посттрансляционные модификации, наблюдаемые для клонов после 4-недельного хранения при температуре +37°C.

### **Пример 7: Результаты анализа растворения кристаллов**

Все клоны оценивали на их способность растворять кристаллы GAL10 *in vitro*.

Вкратце, был разработан и стандартизирован анализ растворения кристаллов (CDA) для оценки биологической активности клонов до и после применения нескольких стрессовых условий, включая распыление. Целью данного исследования было оценить, может ли распыление до/после хранения повлиять на (био)активность клонов, приводя к потере их способности растворять кристаллы GAL10.

Для всех клонов анализ проводили в двух независимых экспериментах при наличии соответствующих контролей анализа. Вкратце, образцы распылялись с помощью активного вибрационного сетчатого распылителя Aerogen Solo, который превращал раствор лекарственного средства во вдыхаемый аэрозоль. Для каждого клона использовали три разных устройства для каждого момента времени, и результаты сообщались по серийному номеру устройства (распылителя). В случае загрязнения устройства, о чем свидетельствует более длительное время распыления, чем обычно, для данного размера аликвоты, были доступны запасные устройства того же типа для завершения распыления с помощью трехкратных устройств. Для распыляемых кандидатов с тройными устройствами аэрозольный белок из одного общего устройства анализировали как кривую с 8 точками концентрации (Solo #0125), а оставшиеся две - с заранее выбранной фиксированной концентрацией, всегда в двух независимых анализах. Образцы после 4 недель хранения при +5°C, +25°C и +37°C анализировали как кривую с 8 точками концентрации для всех клонов. Результаты, проиллюстрированные здесь, взяты из анализов, в которых распределение кристаллов GAL10 по размерам составляло более 10 мкм (10-15 мкм).

На фигуре 7 иллюстрируется способность не подвергавшихся стрессу образцов, содержащих один из четырех клонов, растворять кристаллы GAL10. Затем все клоны были протестированы на эффективность после того, как они подверглись стрессовым условиям, описанным выше, чтобы оценить, могут ли они сохранить эту активность после хранения и/или после распыления, до и после хранения (фигура 8). Клоны 18C06, 20H09 и 23H09 исследовались параллельно в первой серии анализов (фигура 8), а клон 24F02\_N53A исследовался параллельно с клоном 23H09 во второй серии анализов (фигура 9). Клон 7B07\_N53A исследовали в качестве сравнения в первом наборе анализов.

Все клоны были способны полностью растворять кристаллы GAL10 на протяжении всего анализа, независимо от стрессора, приложенного к образцу (фигура 7-9). Следовательно, дальнейший анализ клонов был сосредоточен главным образом на самых ранних моментах времени до 5 часов, когда наблюдалась разница в эффективности между клонами.

Согласно анализам, клоны 23H09 и 24F02\_N53A были наиболее мощными молекулами среди четырех клонов (фигура 9). Для всех независимых экспериментов и независимо от распределения по размерам протестированных кристаллов GAL10 клон 24F02\_N53A был более эффективным с точки зрения его способности растворять кристаллы GAL10 *in vitro*. Температура или стресс, вызванный распылением, не повлияли

на его способность к растворению по сравнению с материалом, не подвергшимся стрессу (фигура 9). На основе приведенных выше анализов кандидаты были ранжированы от наиболее к наименее эффективным:

g24F02\_N53~g23H09>g20C06>g18C06

#### **Пример 8: Иммуногенность клонов-кандидатов**

Не содержащий эндотоксинов материал для всех клонов оценивали на риск иммуногенности с использованием Lonza Epibase®, который включает оценку *in silico* оценку *in vitro* на клеточной основе. Вкратце, при оценке *in silico* использовался алгоритм для скрининга аминокислотных последовательностей клонов на наличие потенциальных иммуногенных эпитопов, включая аллотипы, на которые можно повлиять, и главный комплекс гистосовместимости путем измерения показателя HLA-DRB1. В ходе анализа эти аллотипы были скринингованы в соответствии с их глобальными популяционными частотами (фигура 10). По шкале иммуногенности клоны ранжировали от наименее до наиболее иммуногенных:

g24F02\_N53<[g23H09, g18C06]<g20H09

Эти результаты были подтверждены анализом Lonza Epibase® *in vitro*. Вкратце, кандидатов оценивали на Т-клеточные ответы, индуцированные в PBMC от 31 здорового донора. Скрининг оценивали после обнаружения и подсчета стимулированных клеток IFN $\gamma$  и IL-5 для определения количества доноров, вызывающих Т-клеточный ответ в качестве риска нежелательного иммунного ответа (фигура 11), и его величины в исследуемой популяции (фигура 12). Положительным контролем, использованным в этом исследовании, был клон KLN (фигура 11).

Все протестированные клоны продемонстрировали низкую способность индуцировать иммунные ответы. Среди четырех клонов с точки зрения ответа на IFN $\gamma$  клоны 23H09 и 18C06 продемонстрировали самую высокую частоту, тогда как с точки зрения ответов IL-5 клоны 18C06 и 20H09 продемонстрировали самую высокую частоту. Во всех случаях и при использовании всех статистических подходов считалось, что клон g24F02\_N53A с наименьшей вероятностью вызывает нежелательный Т-клеточный ответ и, таким образом, считается, что этот клон имеет наименьший риск иммуногенности.

#### **ВЫВОД ИЗ ПРИМЕРОВ**

Из подробно изученных клонов клон Fab с зародышевой линией 24F02\_N53A считался наиболее многообещающим клоном, поскольку:

Он оставался стабильным даже после того, как образцы подвергались повышенным температурам хранения, множественным циклам замораживания-оттаивания и воздействию низких значений pH;

Он продемонстрировал сильное связывание с галектином-10;

Способен быстро растворять рекомбинантные кристаллы Gal10 *in vitro*;

Он дал перекрестную реакцию с яванским макаком Gal10;

Предполагается, что он имеет низкий риск иммуногенности у людей; и

Распыление не повлияло на стабильность и связывающие свойства этого клона.



Клон	V <sub>H</sub>	SEQ ID NO.	V <sub>L</sub>	SEQ ID NO.
g24F02_N53 A	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINAGG GSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKGLRVGVLGFDY WGQGTLVTVSS	4	SYELTQPLSVSVALGQTARITCDGNNIG SKSAQWYQQKPGQAPVLVIYADEYRPE GIPERFSGSNSGNTATLTISRAGDEA DYVCQVWDGSAAVFGGGTQLTVL	10
g24F02	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINNGG GSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKGLRVGVLGFDY WGQGTLVTVSS	6	SYELTQPLSVSVALGQTARITCDGNNIG SKSAQWYQQKPGQAPVLVIYADEYRPE GIPERFSGSNSGNTATLTISRAGDEA DYVCQVWDGSAAVFGGGTQLTVL	10
g23H09	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FRSYDMSWVRQAPGKGLEWVSAIAQFQ HWTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCATTHGIGTLGFGS WGQGTLVTVSS	14	SYELTQPLSVSVALGQTARITCDGNNIG SKSAQWYQQKPGQAPVLVIYADEYRPE GIPERFSGSNSGNTATLTISRAGDEA DYVCQVWDGSAAVFGGGTQLTVL	10
g18C06	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSFAMSWVRQAPGKGLEWVSGINSGD GSSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKGGATVWGRFHDIYWGQ GTLVTVSS	18	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNI GSGSYLSWYQQLPGTAPKLLIYNANNR ASGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAED EADYYCGCYDSKLSYVFGGGTKLTVL	22
g20H09	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FRSYDMSWVRQAPGKGLEWVSAIKWH	24	SYELTQPLSVSVALGQTARITCDGNNIG SKSAQWYQQKPGQAPVLVIYADEYRPE	10

RITYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCATTHGIGTLGFGSW GQGTLVTVSS	GIPERFSGSNSGNTATLTISR AQAGDEA DYVCQVWDGSAAVFGGGTQLTVL
--	--

**Таблица 42: Последовательности VH и VL Fab-антител, связывающихся с галектином-10**

клон	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
g24F02_N53A	SYAMS	1	AINAGGGSTSYADSVKG	3	GLRVGVLGFDY	2
g24F02	SYAMS	1	AINNGGGSTSYADSVKG	5	GLRVGVLGFDY	2
g23H09	SYDMS	11	AIAQFQHWTYYADSVK G	13	THGIGTLGFGS	12
g18C06	SFAMS	15	GINSGDGSSVKG	17	GGATVWGRFHDY	16
g20H09	SYDMS	11	AIKWHRITYYADSVKG	23	THGIGTLGFGS	12

**Таблица 43: Последовательности CDR тяжелой цепи Fab-антител, связывающихся с галектином-10**

клон	CDR1	SEQ ID NO.	CDR2	SEQ ID NO.	CDR3	SEQ ID NO.
g24F02_N53A	DGNNIGSKSAQ	7	ADEYRPE	9	QVWDGSAAV	8
g24F02	DGNNIGSKSAQ	7	ADEYRPE	9	QVWDGSAAV	8
g23H09	DGNNIGSKSAQ	7	ADEYRPE	9	QVWDGSAAV	8
g18C06	TGSSSNIGSGSYLS	19	NANNRAS	21	GCYDSKLSTYV	20
g20H09	DGNNIGSKSAQ	7	ADEYRPE	9	QVWDGSAAV	8

**Таблица 44: Последовательности CDR легкой цепи Fab-антител, связывающихся с галектином-10**

**ССЫЛКИ**

1. Selroos O, Kupczyk M, Kuna P, et al. National and regional asthma programmes in Europe. *Eur Respir Rev.* 2015;24(137):474-483.
2. Braido F. Failure in asthma control: reasons and consequences. *Scientifica (Cairo).* 2013;2013:549252.
3. Zhang L, He L, Gong J, Liu C. Risk Factors Associated with Irreversible Airway Obstruction in Asthma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int.* 2016;2016:9868704.
4. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. *Nat Immunol.* 2015;16(1):45-56.
5. Persson EK, Verstraete K, Heyndrickx I, et al. Protein crystallization promotes type 2 immunity and is reversible by antibody treatment. *Science.* 2019;364(6442).
6. Butterfield JH, Ackerman SJ, Scott RE, Pierre RV, Gleich GJ. Evidence for secretion of human eosinophil granule major basic protein and Charcot-Leyden crystal protein during eosinophil maturation. *Exp Hematol.* 1984;12(3):163-170.
7. Acharya KR, Ackerman SJ. Eosinophil granule proteins: form and function. *J Biol Chem.* 2014;289(25):17406-17415.
8. Leonidas DD, Elbert BL, Zhou Z, Leffler H, Ackerman SJ, Acharya KR. Crystal structure of human Charcot-Leyden crystal protein, an eosinophil lysophospholipase, identifies it as a new member of the carbohydrate-binding family of galectins. *Structure.* 1995;3(12):1379-1393.
9. Liu FT. Regulatory roles of galectins in the immune response. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005;136(4):385-400.
10. Weller PF, Bach DS, Austen KF. Biochemical characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase). *J Biol Chem.* 1984;259(24):15100-15105.
11. Ueki S, Tokunaga T, Melo RCN, et al. Charcot-Leyden crystal formation is closely associated with eosinophil extracellular trap cell death. *Blood.* 2018;132(20):2183-2187.
12. el-Hashimi W. Charcot-Leyden crystals. Formation from primate and lack of formation from nonprimate eosinophils. *Am J Pathol.* 1971;65(2):311-324.
13. Rabinovich GA, Rubinstein N, Fainboim L. Unlocking the secrets of galectins: a challenge at the frontier of glyco-immunology. *J Leukoc Biol.* 2002;71(5):741-752.
14. Su J. A Brief History of Charcot-Leyden Crystal Protein/Galectin-10 Research. *Molecules.* 2018;23(11).

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с галектином-10, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где:

(i) домен VH содержит последовательности CDR HCDR3, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 2; HCDR2, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 3; HCDR1, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 1; и

(ii) домен VL содержит последовательности CDR LCDR3, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 8; LCDR2, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 9; LCDR1, содержащие или состоящие из SEQ ID NO: 7.

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичную ей.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или п.2, где:

(i) домен VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; и

(ii) домен VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, включающей: одноцепочечное антитело (scFv); фрагмент F(ab')<sub>2</sub>; Fab-фрагмент; Fd фрагмент; Fv фрагмент; однорукое (одновалентное) антитело; диатела, триатела, тетратела или любую антигенсвязывающую молекулу, образованную комбинацией, сборкой или конъюгацией таких антигенсвязывающих фрагментов.

5. Антигенсвязывающий фрагмент по п.4, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab-фрагмент.

6. Выделенный полинуклеотид или полинуклеотиды, которые кодируют антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, или их домен VH или VL.

7. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.6, функционально связанный с регуляторными последовательностями, которые обеспечивают экспрессию антитела, антигенсвязывающего фрагмента, переменного домена тяжелой цепи или переменного домена легкой цепи в клетке-хозяине или бесклеточной системе экспрессии.

8. Клетка-хозяин или бесклеточная система экспрессии, содержащая вектор экспрессии по п.7.

9. Способ получения рекомбинантного антитела или антигенсвязывающего фрагмента по пп.1-5, включающий культивирование клетки-хозяина или бесклеточной системы экспрессии по п.8 в условиях, которые обеспечивают экспрессию антитела или

антигенсвязывающего фрагмента и выделение экспрессированного антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из по пп.1-5 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из по пп.1-5 или фармацевтическая композиция в соответствии с п.10 для применения в качестве лекарственного препарата.

12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент для применения в соответствии с п.11, где антитело, антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят для предотвращения или лечения заболевания или состояния, связанного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10.

13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент для применения в соответствии с п.11 или п.12, где антитело, антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят для предотвращения или лечения заболевания или состояния, выбранного из группы, включающей: астму, хронический риносинусит, целиакию, гельминтную инфекцию, желудочно-кишечное эозинофильное воспаление, муковисцидоз (CF), аллергический бронхолегочный аспергиллез (ABPA), васкулит Черджа-Строса, хроническую эозинофильную пневмонию и острый миелолейкоз (AML).

14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент для применения в соответствии с п.13, где заболевание или состояние представляет собой астму.

15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент для применения в соответствии с п.13, где заболевание или состояние представляет собой муковисцидоз.

16. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, где способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из по пп.1-5 или фармацевтической композиции в соответствии с п.10.

17. Способ по п.16, где антитело, антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят для предотвращения или лечения заболевания или состояния, связанного с присутствием или образованием кристаллов галектина-10.

18. Способ по п.16 или п.17, где антитело, антигенсвязывающий фрагмент или фармацевтическую композицию вводят для предотвращения или лечения заболевания или состояния, выбранного из группы, включающей: астму, хронический риносинусит, целиакию, гельминтную инфекцию, желудочно-кишечное эозинофильное воспаление, муковисцидоз (CF), аллергический бронхолегочный аспергиллез (ABPA), васкулит Черджа-Строса, хроническую эозинофильную пневмонию и острый миелолейкоз (AML).

19. Способ по п.18, где заболевание или состояние представляет собой астму.

20. Способ по п.18, где заболевание или состояние представляет собой муковисцидоз.

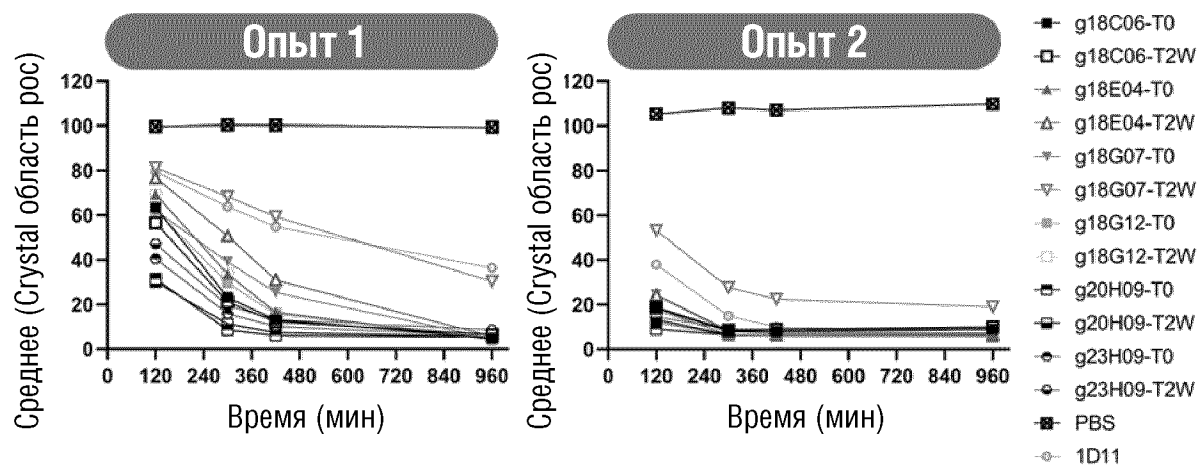
21. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из по пп.1-5 для обнаружения галектина-10 в образце, полученном от пациента.

22. Применение по п.21, где образец от пациента представляет собой образец слизи или образец мокроты.

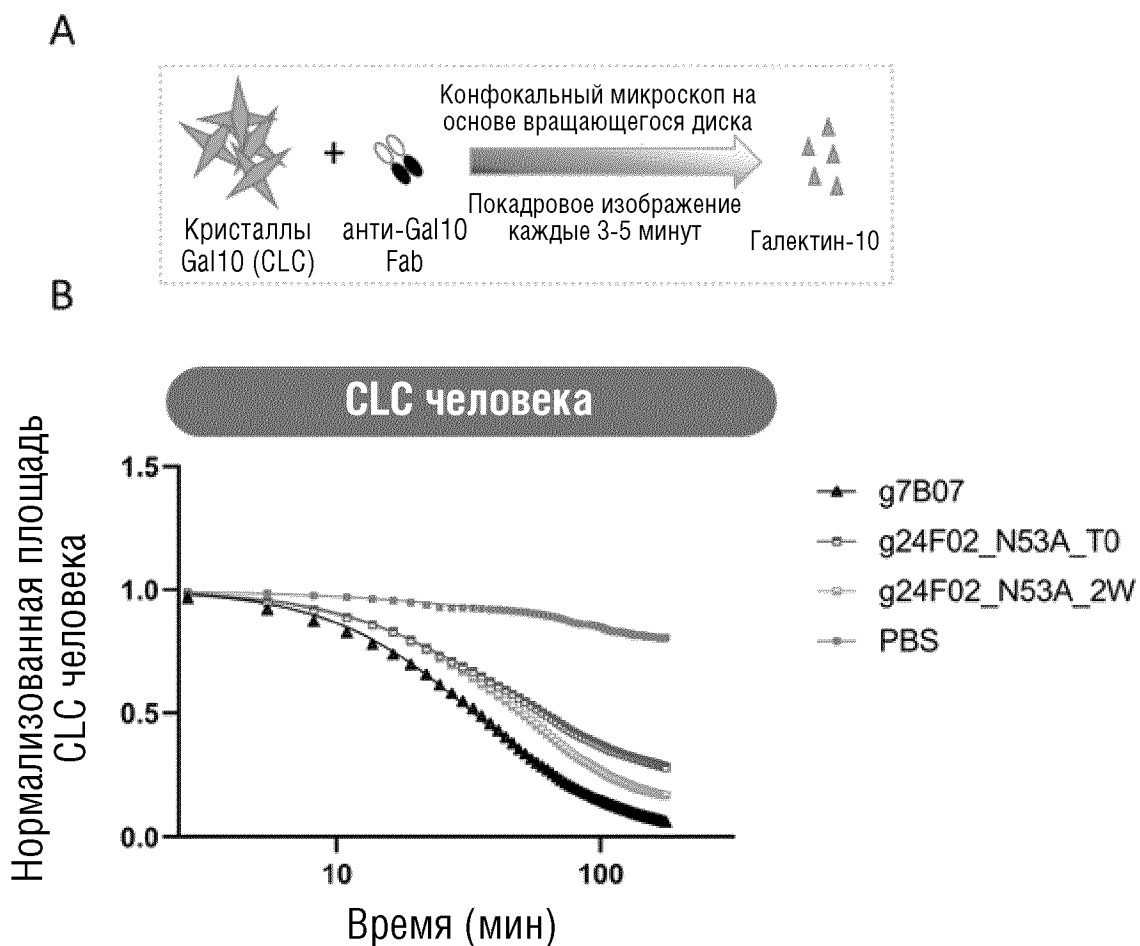
23. Набор, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из по пп.1-5.

По доверенности

ФИГ.1



ФИГ.2



ФИГ.3

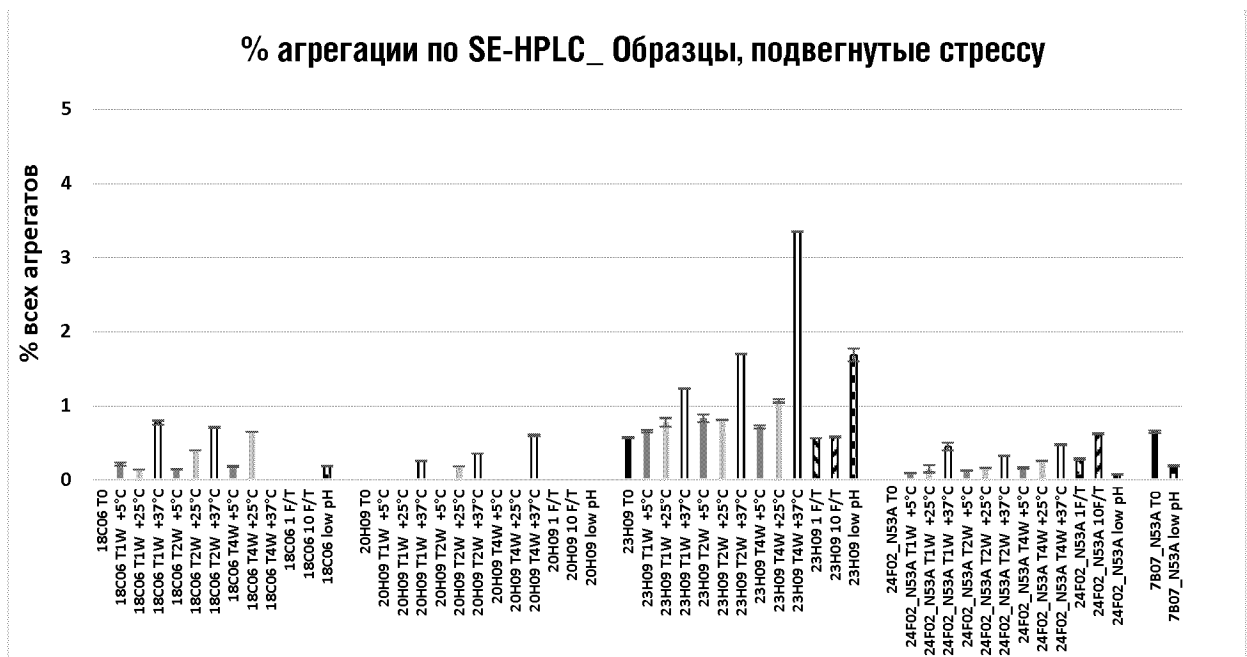


ФИГ.4

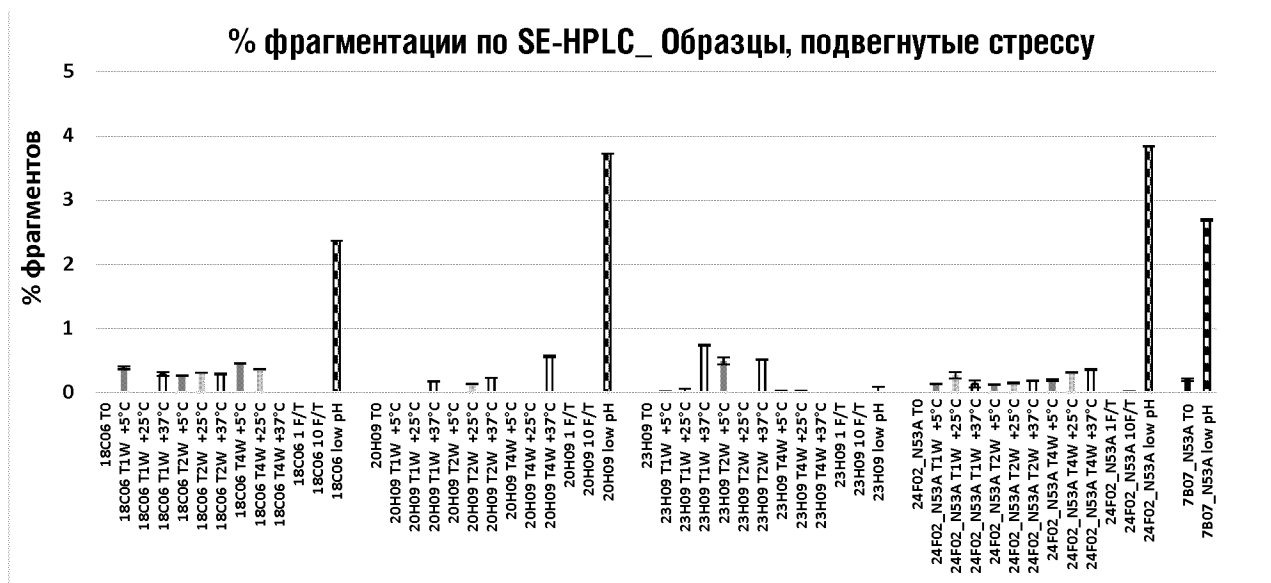




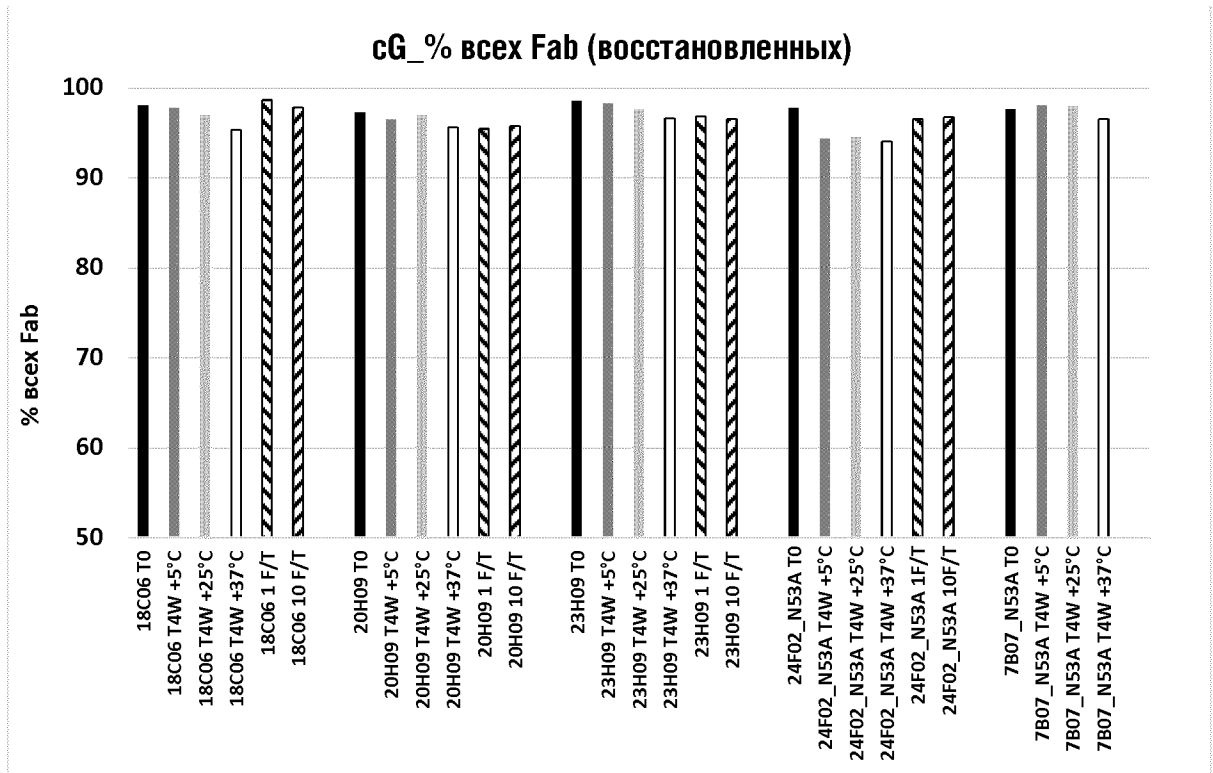
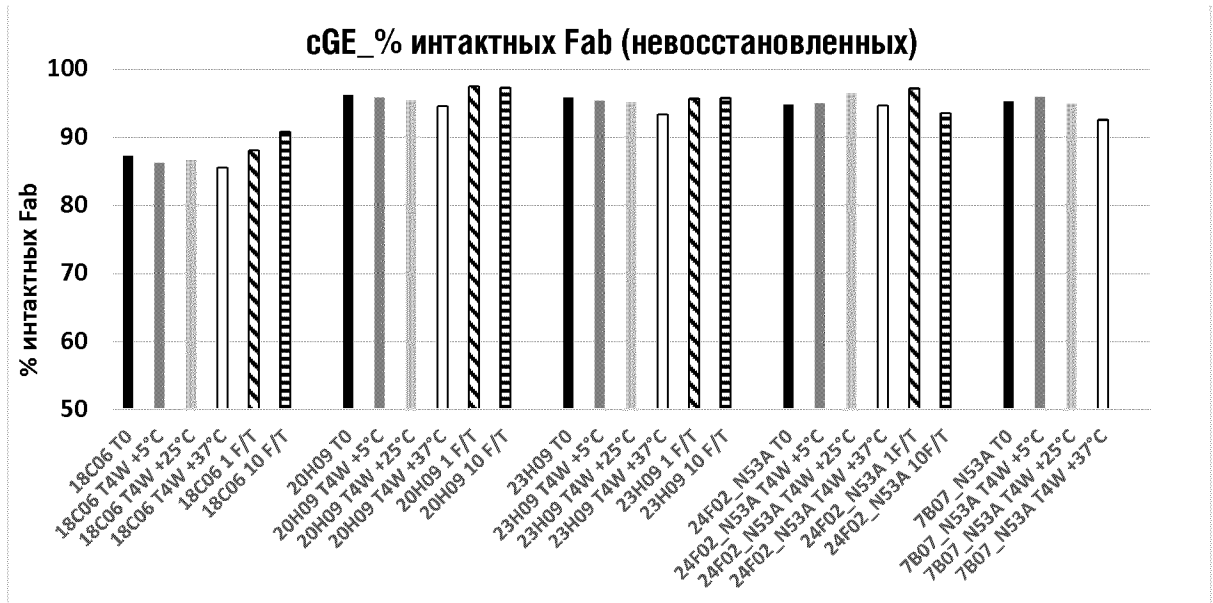
## ФИГ.5



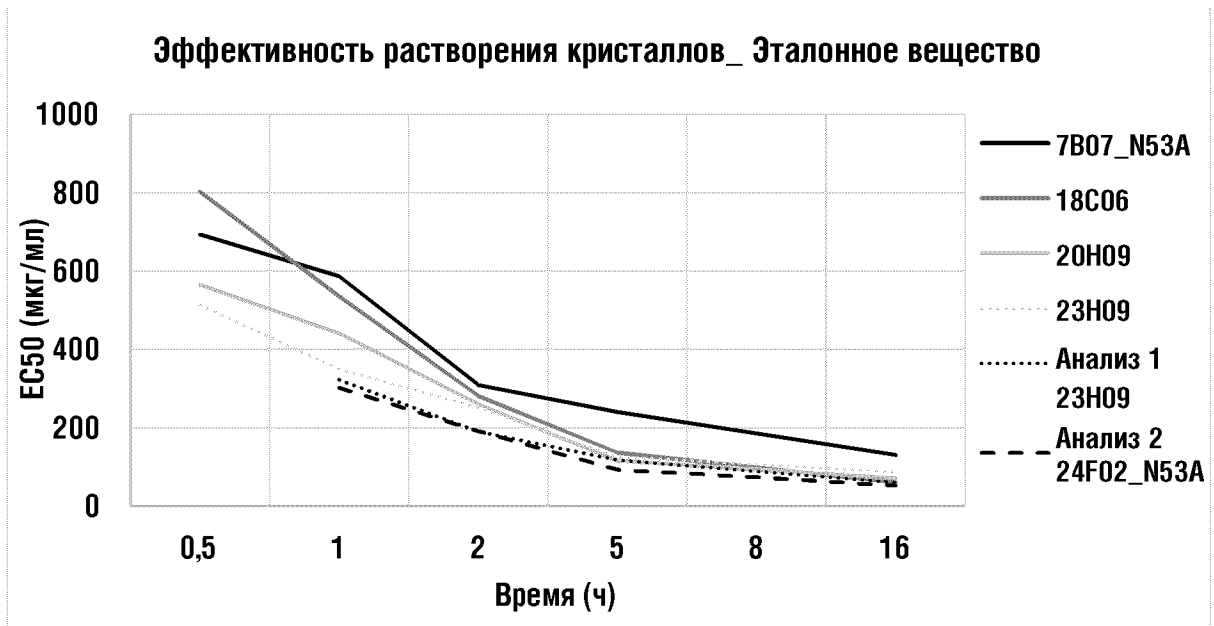
ФИГ.5 (продолжение)



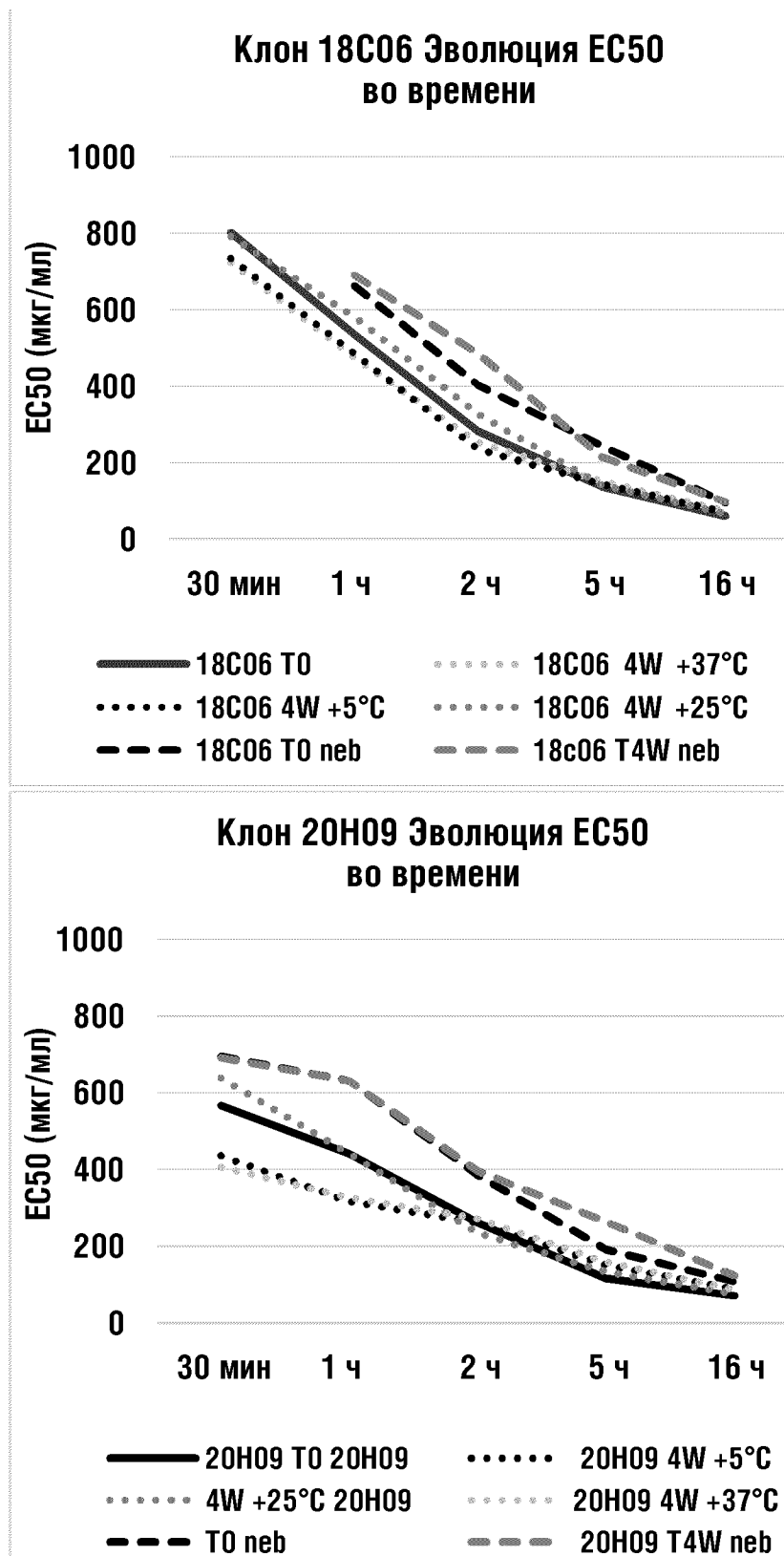
ФИГ.6



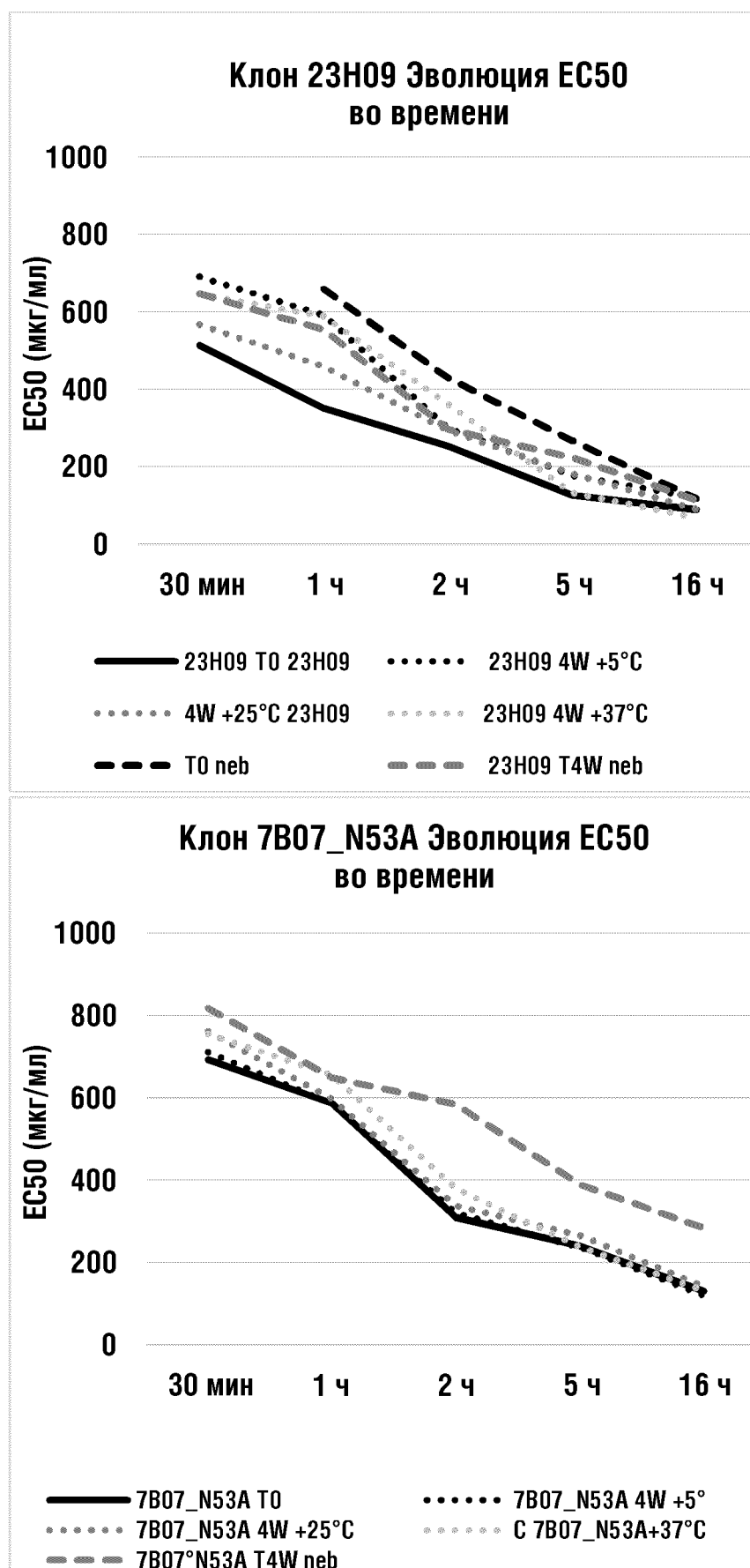
ФИГ.7



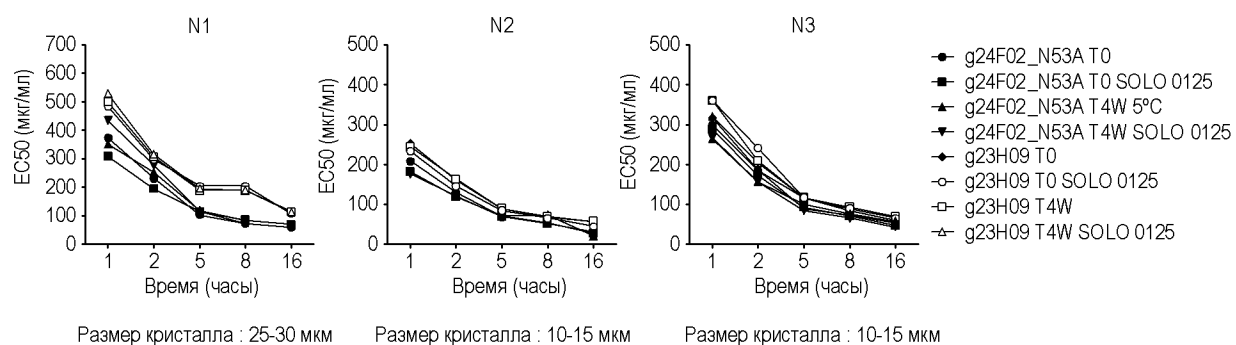
ФИГ.8



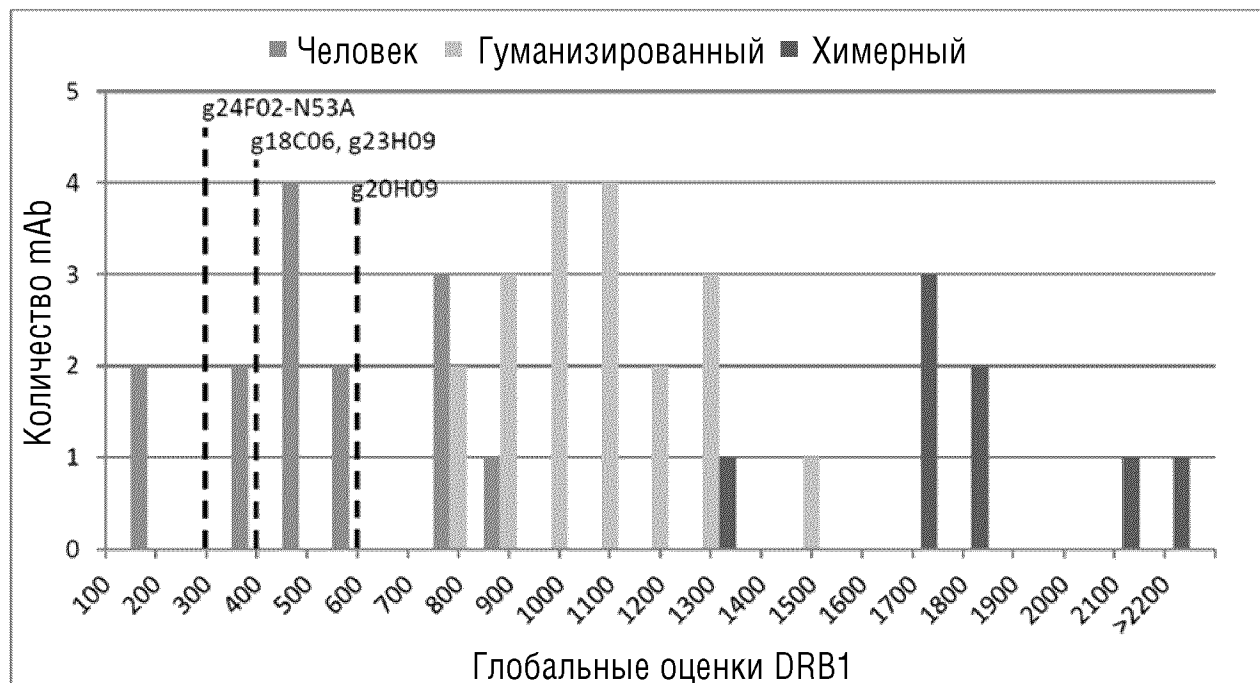
ФИГ.8 (продолжение)



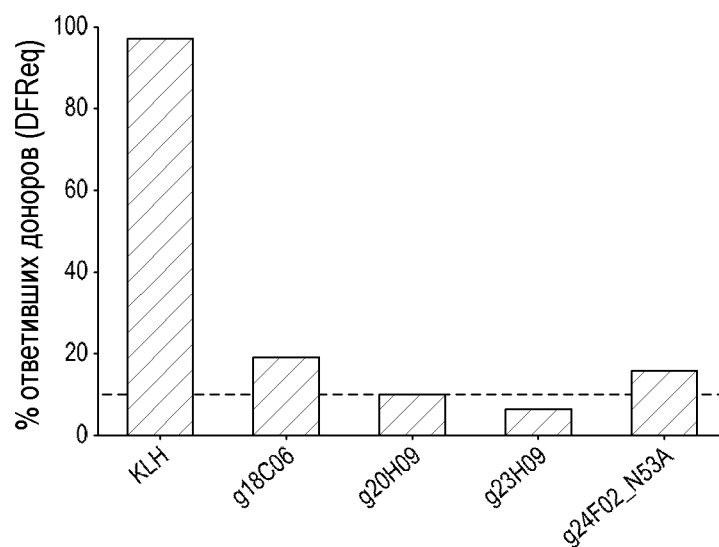
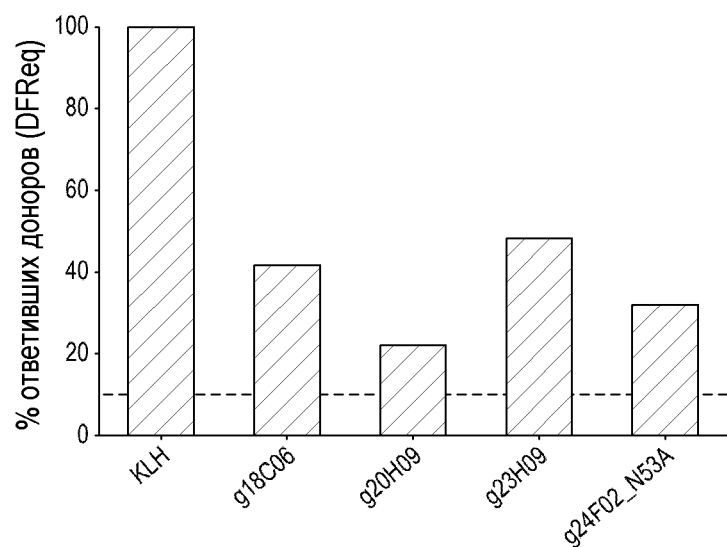
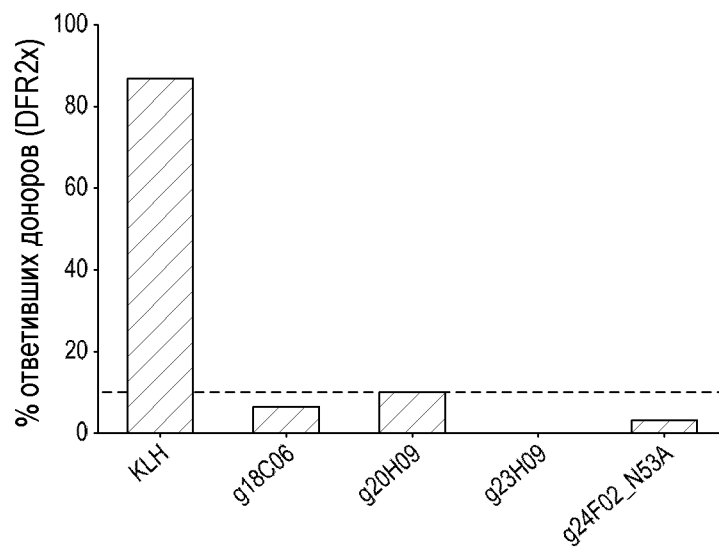
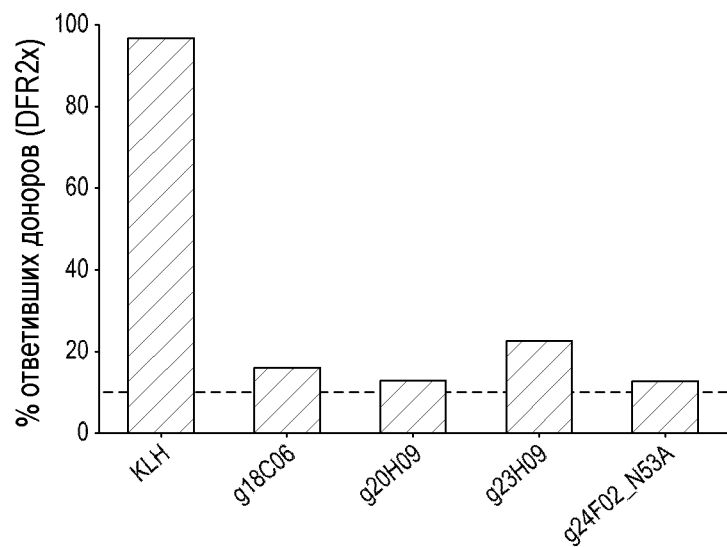
ФИГ.9



ФИГ.10



ФИГ.11





ФИГ.12

