

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202192255** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2022.01.21

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*A61P 1/04* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.02.14

**(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТУЧНОКЛЕТОЧНОГО  
ГАСТРИТА, ТУЧНОКЛЕТОЧНОГО ЭЗОФАГИТА, ТУЧНОКЛЕТОЧНОГО  
ЭНТЕРИТА, ТУЧНОКЛЕТОЧНОГО ДУОДЕНИТА И/ИЛИ ТУЧНОКЛЕТОЧНОГО  
ГАСТРОЭНТЕРИТА**

(31) 62/806,604; 62/925,704

(32) 2019.02.15; 2019.10.24

(33) US

(86) PCT/US2020/018405

(87) WO 2020/168271 2020.08.20

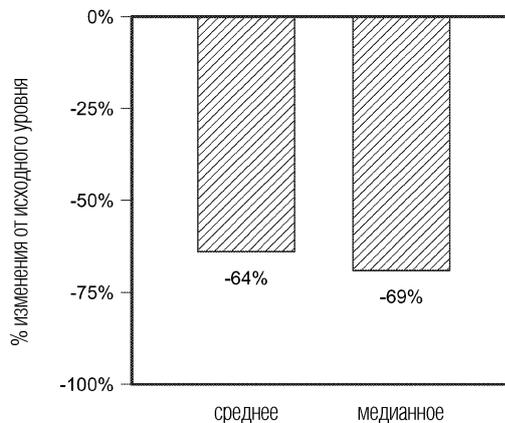
(71) Заявитель:  
АЛЛАКОС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Янгблад Брэдфорд Эндрю, Сингх  
Бхупиндер, Камбодж Амол, Гринвуд  
Саймон, Расмуссен Хенрик (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к способам лечения тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного колита, тучноклеточного энтерита, тучноклеточного дуоденита и/или тучноклеточного гастроэнтерита. В частности, настоящее изобретение представляет способы лечения тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного колита, тучноклеточного энтерита, тучноклеточного дуоденита и/или тучноклеточного гастроэнтерита введением антитела, которое связывается с Siglec-8 человека, или композиции, содержащей указанное антитело. В настоящем описании также представлены готовые изделия или наборы, содержащие антитела, которые связываются с Siglec-8 человека, для лечения тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного колита, тучноклеточного энтерита, тучноклеточного дуоденита и/или тучноклеточного гастроэнтерита.

общая оценка симптомов  
исходный уровень к последним 2 неделям лечения



**A1**

**202192255**

**202192255**

**A1**

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

2420-570186EA/032

### **СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТУЧНОКЛЕТОЧНОГО ГАСТРИТА, ТУЧНОКЛЕТОЧНОГО ЭЗОФАГИТА, ТУЧНОКЛЕТОЧНОГО ЭНТЕРИТА, ТУЧНОКЛЕТОЧНОГО ДУОДЕНИТА И/ИЛИ ТУЧНОКЛЕТОЧНОГО ГАСТРОЭНТЕРИТА**

#### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

По данной заявке испрашивается приоритет на основании предварительной заявки США с серийными номерами 62/806,604, поданной 15 февраля 2019 г., и 62/925,704, поданной 24 октября 2019 г., описания каждой из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

#### **ПРЕДСТАВЛЕНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII**

Содержание следующей заявки в текстовом файле ASCII полностью включено в настоящий документ посредством ссылки: машиночитаемая форма (CRF) списка последовательностей (имя файла: 701712001040SEQLIST.TXT, дата записи: 13 февраля 2020 г., размер: 106 КБ).

#### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

Настоящее описание относится к способам лечения тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного колита, тучноклеточного энтерита, тучноклеточного дуоденита и/или тучноклеточного гастроэнтерита введением антител, которые связываются с человеческими Siglec-8, и композиций, содержащих указанные антитела.

#### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Siglec-8, член CD33-родственного семейства связывающих сиаловую кислоту иммуноглобулиноподобных лектинов (Siglec), представляет собой трансмембранный белок клеточной поверхности с ограниченным распределением в тканях, селективно экспрессирующийся на поверхности эозинофилов, тучных клеток и, в более низких уровнях, на базофилах. Siglec-8 содержит 3 внеклеточных иммуноглобулиноподобных домена, трансмембранную область и цитоплазматический хвост, содержащий 2 сигнальных мотива на основе тирозина, включая ингибиторный мотив на основе иммунорецептора тирозина с ингибирующей функцией. Вовлечение Siglec-8 в тучных клетках может привести к ингибированию высвобождения медиатора, а в эозинофилах может вызвать апоптоз (Bochner, B. (2009) Clin. Exp. Allergy 39:317-324).

Не существует одобренных FDA терапий для гастрита и/или гастроэнтерита с увеличенными тучными клетками. Текущие терапии и лечение этих пациентов включают множество различных подходов, включая ингибиторы протонной помпы, антигистаминные препараты, ограниченные/элементарные диеты, стабилизаторы тучных клеток, системные или пероральные кортикостероиды и периодическое использование иммуномодулирующих биопрепаратов не по назначению. Таким образом, сохраняется

потребность в эффективном лечении этих и родственных нарушений.

Все ссылки, цитируемые в настоящем документе, включая заявки на патенты, патентные публикации и научную литературу, включены в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте, как если бы каждая отдельная ссылка была специально и индивидуально указана для включения посредством ссылки.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для удовлетворения этой и других потребностей, настоящее изобретение относится, *среди прочего*, к способам лечения или профилактики тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного энтерита, тучноклеточного колита, тучноклеточного дуоденита и/или тучноклеточного гастроэнтерита введением антител, которые связываются с Siglec-8 человека, и/или композиций, содержащих указанные антитела. Эти способы позволяют лечить людей с одним или несколькими симптомами эзофагита, гастрита, энтерита, дуоденита и/или гастроэнтерита с повышенным содержанием тучных клеток в тканях (*например*, и не соответствующих клиническим критериям эозинофильного эзофагита, гастрита, колита, дуоденита, энтерита и/или гастроэнтерита).

Соответственно, определенные аспекты настоящего описания относятся к способам лечения или профилактики одного или нескольких симптомов гастрита, энтерита, дуоденита или гастроэнтерита у индивидуума, включающим: (а) определение количества тучных клеток в первом образце, полученном из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки индивидуума; (б) определение количества эозинофилов во втором образце, полученном из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки индивидуума; и (с) если первый образец имеет повышенное количество тучных клеток по сравнению с эталоном тучных клеток, а второй образец не имеет повышенного количества эозинофилов по сравнению с эталоном эозинофилов, введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащий антитело, которое связывается с Siglec-8 человека. Другие аспекты настоящего описания относятся к способам лечения или профилактики тучноклеточного гастрита, тучноклеточного энтерита, тучноклеточного дуоденита, или тучноклеточного гастроэнтерита у индивидуума, включающим: (а) определение количества тучных клеток в первом образце, полученном из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки индивидуума; (б) определение количества эозинофилов во втором образце, полученном из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки индивидуума; и (с) если первый образец имеет повышенное количество тучных клеток по сравнению с эталоном тучных клеток, а второй образец не имеет повышенного количества эозинофилов по сравнению с эталоном эозинофилов, введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащий антитело, которое связывается с Siglec-8 человека. Другие аспекты настоящего описания относятся к способам лечения

индивидуума, имеющего один или несколько симптомов гастрита, энтерита, дуоденита или гастроэнтерита, включающим: (а) определение количества тучных клеток в первом образце, полученном из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки человека; (b) определение количества эозинофилов во втором образце, полученном из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки индивидуума; и (с) если первый образец имеет повышенное количество тучных клеток по сравнению с эталоном тучных клеток, а второй образец не имеет повышенного количества эозинофилов по сравнению с эталоном эозинофилов, введение индивидууму эффективного количества композиции содержащий антитело, которое связывается с Siglec-8 человека.

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к способам лечения или профилактики одного или нескольких симптомов гастрита, энтерита, дуоденита или гастроэнтерита у индивидуума, включающим введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, где индивидуум имеет повышенное количество тучных клеток, по меньшей мере, в части слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки по сравнению с эталоном тучных клеток, и при этом индивидуум не имеет повышенного количества эозинофилов, по меньшей мере, в части слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки по сравнению с эталоном эозинофилов. Другие аспекты настоящего описания относятся к способам лечения или профилактики тучноклеточного гастрита, тучноклеточного энтерита, тучноклеточного дуоденита или тучноклеточного гастроэнтерита у индивидуума, включающим введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, где индивидуум имеет повышенное количество тучных клеток, по меньшей мере, в части слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки по сравнению с эталоном тучных клеток, и при этом индивидуум не имеет повышенного количества эозинофилов, по меньшей мере, в части слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки по сравнению с эталоном эозинофилов. Другие аспекты настоящего описания относятся к способам лечения индивидуума, имеющего один или несколько симптомов гастрита, энтерита, дуоденита или гастроэнтерита, включающим введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, при этом индивидуум имеет повышенное количество тучных клеток, по меньшей мере, в части слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки по сравнению с эталоном тучных клеток, и при этом индивидуум не имеет повышенного количества эозинофилов, по меньшей мере, в части слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки по

сравнению с эталоном эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления первый образец, полученный из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки индивидуума, имеет повышенное количество тучных клеток по сравнению с эталоном тучных клеток. В некоторых вариантах реализации второй образец, полученный из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки индивидуума, не имеет повышенного количества эозинофилов по сравнению с эталоном эозинофилов.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми другими вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, первый и второй образцы являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй образцы взяты из ткани одного и того же типа. В некоторых вариантах осуществления, один или оба из первого и второго образцов взяты из биопсии желудка или двенадцатиперстной кишки. В некоторых вариантах осуществления, один или оба из первого и второго образцов взяты при эзофагогастродуоденоскопии (EGD) с биопсией. В некоторых вариантах осуществления, первый образец имеет, по меньшей мере, три поля зрения при большом увеличении (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 30 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления, первый образец имеет, по меньшей мере, три поля зрения (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 25 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления, первый образец имеет, по меньшей мере, три поля зрения (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 20 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления, первый образец имеет, по меньшей мере, два поля зрения (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 30 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления, первый образец имеет, по меньшей мере, два поля зрения (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 25 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления, первый образец имеет, по меньшей мере, два поля зрения (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 20 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления, первый образец имеет, по меньшей мере, одно поле зрения (HPF), в котором количество тучных клеток составляет 30 или более тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления, первый образец имеет, по меньшей мере, одно поле зрения (HPF), в котором количество тучных клеток составляет 25 или более тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления, первый образец имеет, по меньшей мере, одно поле зрения (HPF), в котором количество тучных клеток составляет 20 или более тучных клеток. В некоторых вариантах реализации тучные клетки обнаруживают иммуногистохимическим (ИНС) окрашиванием на триптазу, CD117 (c-kit) или рецептор IgE. В некоторых вариантах осуществления, второй образец содержит одно или несколько HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов менее 30 эозинофилов в HPF. В некоторых вариантах осуществления второй образец получают из слизистой оболочки желудка индивидуума, и второй образец не содержит, по меньшей мере, пяти HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов 30 или более

в HPF. В некоторых вариантах осуществления, второй образец получают из слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки индивидуума, и второй образец не содержит, по меньшей мере, трех HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов 30 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления, количество тучных клеток в первом образце определяется за 45 дней или менее до введения композиции.

В некоторых вариантах осуществления в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, у индивидуума была диагностирована гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (GERD) (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом). В некоторых вариантах осуществления, индивидуум невосприимчив к антацидам, H<sub>2</sub> блокаторам и/или ингибиторам протонной помпы. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума есть или был диагностирован синдром раздраженного кишечника (IBS) (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом). В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума имеется или диагностирована функциональная диспепсия (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом). В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума имеется или было диагностировано одно или несколько из следующих состояний: боль в животе, спазмы в животе, тошнота, рвота, диарея, вздутие живота и раннее насыщение без установленной причины (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом). В некоторых вариантах осуществления, индивидуум не поддается и/или невосприимчив к фармакологическому и/или диетическому вмешательству. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума ранее был (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом) или был диагностирован (*например*, в анамнезе) эозинофильный гастрит, но в настоящее время у него отсутствуют повышенные эозинофилы. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума был (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом) или ранее был диагностирован (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом) эозинофильный гастрит и у индивидуума есть один или несколько симптомов эозинофильного гастрита без повышенного содержания эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума ранее был (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом) или был поставлен диагноз (*например*, в анамнезе) эозинофильный гастроэнтерит, но в настоящее время у него отсутствуют повышенные эозинофилы. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума был (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом) или ранее был диагностирован (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом) эозинофильный гастроэнтерит и у индивидуума есть один или несколько симптомов эозинофильного гастроэнтерита без повышенного содержания эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума был (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом) или ранее был диагностирован (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом) эозинофильный энтерит и у индивидуума есть один или несколько симптомов эозинофильного энтерита без повышенного содержания эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума был (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом) или ранее был диагностирован (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом) эозинофильный дуоденит и у индивидуума есть один или несколько симптомов

эозинофильного дуоденита без повышенного содержания эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума имеется или диагностирована функциональная диспепсия (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом). В некоторых вариантах осуществления, одна или обе из количества или активности тучных клеток в образце, полученном из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки индивидуума, снижаются после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции. В некоторых вариантах осуществления, до введения композиции у индивидуума не достигнуто успеха или не получен адекватный контроль одним или несколькими стандартными способами лечения гастрита или гастроэнтерита. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько стандартных способов лечения гастрита или гастроэнтерита выбраны из группы, состоящей из лечения ингибитором протонной помпы (PPI), лечения кортикостероидами и диетического лечения. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько симптомов гастрита или гастроэнтерита у индивидуума снижаются после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько симптомов гастрита, дуоденита, энтерита или гастроэнтерита у индивидуума уменьшаются, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, 55%, по меньшей мере, 60%, или по меньшей мере 65% после введения композиции по сравнению с исходным уровнем перед введением композиции. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из боли в животе, тошноты, рвоты, потери аппетита, спастических болей в животе, переполнения желудка до окончания еды, вздутия живота, диареи и жидких или водянистых испражнений у индивидуума снижаются после введения композиции по сравнению с исходным уровнем перед введением композиции.

Другие аспекты настоящего описания относятся к способам лечения или профилактики одного или нескольких симптомов эзофагита у индивидуума, включающим: (a) определение количества тучных клеток в первом образце, полученном из слизистой оболочки пищевода индивидуума; (b) определение количества эозинофилов во втором образце, полученном из слизистой оболочки пищевода индивидуума; и (c) если первый образец имеет повышенное количество тучных клеток по сравнению с эталоном тучных клеток, а второй образец не имеет повышенного количества эозинофилов по сравнению с эталоном эозинофилов, введение индивидууму эффективного количества композиции содержащий антитело, которое связывается с Siglec-8 человека. Другие аспекты настоящего описания относятся к способам лечения или профилактики тучноклеточного эзофагита у индивидуума, включающим: (a) определение количества тучных клеток в первом образце, полученном из слизистой оболочки пищевода индивидуума; (b) определение количества эозинофилов во втором образце, полученном из слизистой оболочки пищевода индивидуума; и (c) если первый образец имеет повышенное количество тучных клеток по сравнению с эталоном тучных клеток, а второй образец не имеет повышенного количества эозинофилов по сравнению с эталоном

эозинофилов, введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека. Другие аспекты настоящего описания относятся к способам лечения индивидуума, имеющего один или несколько симптомов эзофагита, включающим: (a) определение количества тучных клеток в первом образце, полученном из слизистой оболочки пищевода индивидуума; (b) определение количества эозинофилов во втором образце, полученном из слизистой оболочки пищевода индивидуума; и (c) если первый образец имеет повышенное количество тучных клеток по сравнению с эталоном тучных клеток, а второй образец не имеет повышенного количества эозинофилов по сравнению с эталоном эозинофилов, введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека.

Другие аспекты настоящего описания относятся к способам лечения или профилактики одного или нескольких симптомов эзофагита у индивидуума, включающим введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, при этом индивидуум имеет повышенное количество тучных клеток, по меньшей мере, в части слизистой оболочки пищевода по сравнению с эталоном тучных клеток, и при этом индивидуум не имеет повышенного количества эозинофилов, по меньшей мере, в части слизистой оболочки пищевода по сравнению с эталоном эозинофилов. Другие аспекты настоящего описания относятся к способам лечения или профилактики тучноклеточного эзофагита у индивидуума, включающим введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, при этом индивидуум имеет повышенное количество тучных клеток, по меньшей мере, в части слизистой оболочки пищевода по сравнению с эталоном тучных клеток, и при этом у индивидуума не наблюдается повышенного количества эозинофилов, по меньшей мере, в части слизистой оболочки пищевода по сравнению с эталоном эозинофилов. Другие аспекты настоящего описания относятся к способам лечения индивидуума, имеющего один или несколько симптомов эзофагита, включающим введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, при этом индивидуум имеет повышенное количество тучных клеток, по меньшей мере, в части слизистой оболочки пищевода по сравнению с эталоном тучных клеток, и при этом индивидуум не имеет повышенного количества эозинофилов, по меньшей мере, в части слизистой оболочки пищевода по сравнению с эталоном эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления первый образец, полученный из слизистой оболочки пищевода индивидуума, имеет повышенное количество тучных клеток по сравнению с эталоном тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления второй образец, полученный из слизистой оболочки пищевода индивидуума, не имеет повышенного количества эозинофилов по сравнению с эталоном эозинофилов.

В некоторых вариантах осуществления, первый и второй образцы являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления, один или оба из первого и второго

образцов взяты из образца биопсии пищевода. В некоторых вариантах осуществления, один или оба из первого и второго образцов взяты при эзофагогастродуоденоскопии (EGD) с биопсией. В некоторых вариантах осуществления, первый образец имеет, по меньшей мере, одно поле зрения (HPF) с количеством тучных клеток 10 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления, первый образец имеет, по меньшей мере, одно поле зрения (HPF) с количеством тучных клеток 15 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления тучные клетки выявляют иммуногистохимическим (ИНС) окрашиванием на триптазу, CD117 (c-kit) или рецептор IgE. В некоторых вариантах осуществления, второй образец содержит одно или несколько HPF с количеством эозинофилов менее 10 эозинофилов в HPF. В некоторых вариантах осуществления, второй образец не имеет HPF с числом эозинофилов 10 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления, второй образец содержит один или несколько HPF с количеством эозинофилов менее 15 эозинофилов в HPF. В некоторых вариантах осуществления, второй образец не имеет HPF с числом эозинофилов 15 или более эозинофилов в HPF.

В некоторых вариантах осуществления, одно или несколько из количества, активности или местоположения тучных клеток в образце, полученном из слизистой оболочки пищевода индивидуума, уменьшаются после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции. В некоторых вариантах осуществления, до введения композиции у пациента не было успешным или не получился адекватный контроль состояния одним или несколькими стандартными способами лечения эзофагита. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько симптомов эзофагита у индивидуума снижаются после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько симптомов эзофагита у индивидуума уменьшаются на, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 55%, по меньшей мере, 60%, или по меньшей мере, 65% после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько из изжоги, тошноты, дисфагии/затрудненного глотания, рвоты, боли в животе, кашля, пищевого сдавления, раннего насыщения, потери аппетита, боли в груди, пищевой непереносимости или отказа и гастроэзофагеального рефлюкса у индивидуума снижаются после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции.

Другие аспекты настоящего описания относятся к способам лечения или профилактики одного или нескольких симптомов колита (*например*, язвенного колита) у индивидуума, включающим: (а) определение количества тучных клеток в первом образце, полученном из слизистой оболочки толстой кишки индивидуума; (б) определение количества эозинофилов во втором образце, полученном из слизистой оболочки толстой кишки индивидуума; и (с) если первый образец имеет повышенное количество тучных клеток по сравнению с эталоном тучных клеток, а второй образец не имеет повышенного количества эозинофилов по сравнению с эталоном эозинофилов, введение индивидууму эффективного количества композиции содержащий антитело, которое связывается с

Siglec-8 человека. Другие аспекты настоящего описания относятся к способам лечения или профилактики тучноклеточного колита (*например*, язвенного колита) у индивидуума, включающим: (а) определение количества тучных клеток в первом образце, полученном из слизистой оболочки толстой кишки индивидуума; (b) определение количества эозинофилов во втором образце, полученном из слизистой оболочки толстой кишки индивидуума; и (с) если первый образец имеет повышенное количество тучных клеток по сравнению с эталоном тучных клеток, а второй образец не имеет повышенного количества эозинофилов по сравнению с эталоном эозинофилов, введение индивидууму эффективного количества композиции содержащий антитело, которое связывается с Siglec-8 человека. Другие аспекты настоящего описания относятся к способам лечения индивидуума, имеющего один или несколько симптомов колита (*например*, язвенного колита), включающим: (а) определение количества тучных клеток в первом образце, полученном из слизистой оболочки толстой кишки индивидуума; (b) определение количества эозинофилов во втором образце, полученном из слизистой оболочки толстой кишки индивидуума; и (с) если первый образец имеет повышенное количество тучных клеток по сравнению с эталоном тучных клеток, а второй образец не имеет повышенного количества эозинофилов по сравнению с эталоном эозинофилов, введение индивидууму эффективного количества композиции содержащий антитело, которое связывается с Siglec-8 человека.

Другие аспекты настоящего описания относятся к способам лечения или профилактики одного или нескольких симптомов колита (*например*, язвенного колита) у индивидуума, включающим введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, где индивидуум имеет повышенное количество тучных клеток, по меньшей мере, в части слизистой оболочки толстой кишки по сравнению с эталоном тучных клеток, и где индивидуум не имеет повышенного количества эозинофилов, по меньшей мере, в части слизистой оболочки толстой кишки. по сравнению с эталоном эозинофилов. Другие аспекты настоящего описания относятся к способам лечения или профилактики тучноклеточного колита (*например*, язвенного колита) у индивидуума, включающим введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, при этом индивидуум имеет повышенное количество тучных клеток, по меньшей мере, в части слизистой оболочки толстой кишки по сравнению с эталоном тучных клеток, и при этом индивидуум не имеет повышенного количества эозинофилов, по меньшей мере, в части слизистой оболочки толстой кишки по сравнению с эталоном эозинофилов. Другие аспекты настоящего описания относятся к способам лечения индивидуума, имеющего один или несколько симптомов колита (*например*, язвенного колита), включающим введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, при этом индивидуум имеет повышенное количество тучных клеток, по меньшей мере, в части слизистой оболочки толстой кишки по сравнению с эталоном тучных клеток, и при

этом индивидуум не имеет повышенного количества эозинофилов, по меньшей мере, в части слизистой оболочки толстой кишки по сравнению с эталоном эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления первый образец, полученный из слизистой оболочки толстой кишки индивидуума, имеет повышенное количество тучных клеток по сравнению с эталоном тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления второй образец, полученный из слизистой оболочки толстой кишки индивидуума, не имеет повышенного количества эозинофилов по сравнению с эталоном эозинофилов.

В некоторых вариантах осуществления, первый образец имеет, по меньшей мере, одно поле зрения (HPF) с количеством тучных клеток 20 или более, 25 или более, 30 или более или 20-30 тучных клеток в HPF. В некоторых вариантах осуществления второй образец содержит одно или несколько HPF с количеством эозинофилов менее 60 эозинофилов в HPF. В некоторых вариантах осуществления второй образец не имеет одно или несколько HPF с количеством эозинофилов более чем 60 эозинофилов в HPF. В некоторых вариантах осуществления, первый и второй образцы одинаковы. В некоторых вариантах осуществления тучные клетки выявляют иммуногистохимическим (ИНС) окрашиванием на триптазу, CD117 или рецептор IgE. В некоторых вариантах осуществления, количество тучных клеток в первом образце определяется за 45 дней или менее до введения композиции. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума был или ранее был диагностирован эозинофильный колит, и у индивидуума есть один или несколько симптомов эозинофильного колита без повышенного содержания эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления, одно или оба из количества или активности тучных клеток в образце, полученном из слизистой оболочки толстой кишки индивидуума, уменьшаются после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции. В некоторых вариантах осуществления до введения композиции у пациента не было успешным или не получился адекватный контроль состояния одним или несколькими стандартными способами лечения колита. В некоторых вариантах осуществления один или несколько симптомов колита у индивидуума снижаются после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции. В некоторых вариантах осуществления один или несколько симптомов колита у индивидуума уменьшается на, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 55%, по меньшей мере, 60%, или по меньшей мере, 65% после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми другими вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, композицию вводят путем внутривенной инфузии. В некоторых вариантах осуществления, композицию вводят путем внутривенной инфузии один раз в месяц в течение 3 или более месяцев, каждые 4 недели или каждые 28 дней. В некоторых вариантах осуществления, композицию вводят путем внутривенной инфузии один раз за цикл в течение 1, 2, 3, 4, 5 или 6 циклов, при этом каждый цикл составляет 1 месяц, 4 недели или 28 дней. В некоторых вариантах осуществления, композицию вводят подкожной инъекцией. В

некоторых вариантах осуществления, изобретения композицию вводят путем внутривенной инфузии в одной или нескольких дозах, содержащих от примерно 0,3 мг/кг до 3,0 мг/кг на антитела. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение индивидууму первой дозы, содержащей примерно 0,3 мг/кг антитела, второй дозы, содержащей примерно 1,0 мг/кг антитела, и третьей дозы, содержащей примерно 3,0 мг/кг антитела. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение индивидууму первой дозы, содержащей примерно 0,3 мг/кг антитела в день 1, второй дозы, содержащей примерно 1,0 мг/кг антитела, между 26 и 32 днями, третьей дозы, содержащей примерно 3,0 мг/кг антитела между 54 и 60 днями, четвертой дозы, содержащей примерно 3,0 мг/кг антитела между 82 и 88 днями, пятой дозы, содержащей примерно 3,0 мг/кг антитела между 110 и 116 днями, и шестой дозы, содержащей примерно 3,0 мг/кг антитела, между 138 и 144 днями.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с любыми другими вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, антитело содержит область Fc и связанные с N-гликозидом углеводные цепи, связанные с областью Fc, где менее 50% связанных с N-гликозидом углеводных цепей антитела в композиции содержат фукозный остаток. В некоторых вариантах осуществления, по существу ни одна из связанных с N-гликозидом углеводных цепей антитела в композиции не содержит фукозный остаток. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи включает (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и/или где переменная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 67-70; и/или где переменная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16 или 21. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит переменную область



аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; (6) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; и (7) LC-FR4, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит: (а) переменную область тяжелой цепи, содержащую: (1) HC-FR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (2) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; (3) HC-FR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; (4) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; (5) HC-FR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; (6) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и (7) HC-FR4, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45; и/или (б) переменную область легкой цепи, содержащую: (1) LC-FR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; (2) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; (3) LC-FR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51; (4) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65; (5) LC-FR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; (6) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; и (7) LC-FR4, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит: переменную область тяжелой цепи, содержащую (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; и/или переменную область легкой цепи, содержащую (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и (iii) HVR -L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103; переменную область тяжелой цепи, содержащую (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 95; и/или переменную область легкой цепи, содержащую (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и (iii) HVR -L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104; или переменную область тяжелой цепи, содержащую (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96; и/или переменную область легкой цепи, содержащую (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и (iii) HVR -L3, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит: переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106; и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109; переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110; или переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108; и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111. В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 примата, не являющегося человеком. В некоторых вариантах осуществления приматом, не являющимся человеком, является павиан. В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с эпитопом в домене 1 Siglec-8 человека, где домен 1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с эпитопом в домене 3 Siglec-8 человека, где домен 3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело 4F11. В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с эпитопом в домене 2 или домене 3 Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления, домен 2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело 1C3. В некоторых вариантах осуществления, домен 3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело 1H10. В некоторых вариантах осуществления, антитело связывается с эпитопом в домене 1 Siglec-8 человека и конкурирует с антителом 4F11 за связывание с Siglec-8. В некоторых вариантах осуществления, антитело не конкурирует с антителом 2E2 за связывание с Siglec-8. В некоторых вариантах осуществления, антитело не является антителом 2E2. В некоторых вариантах осуществления, домен 1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления, антителом является антитело человека, гуманизованное антитело или химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит Fc область тяжелой цепи, содержащую Fc область IgG человека. В некоторых вариантах осуществления, Fc область IgG человека содержит Fc область IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления, Fc область IgG1 человека не фукозилирована. В некоторых вариантах осуществления, Fc область IgG человека содержит Fc область IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления, Fc область IgG4 человека содержит аминокислотную замену S228P, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом ЕС, как в Kabat. В некоторых вариантах осуществления, антитело истощает эозинофилы крови и/или ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления, антитело сконструировано для

повышения активности антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит, по меньшей мере, одну аминокислотную замену в области Fc, которая улучшает активность ADCC. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна или две тяжелые цепи антитела не фукозилированы. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 76 или 77. В некоторых вариантах осуществления, антителом является моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления, которые могут быть объединены с другими вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, композицию вводят в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами для лечения или профилактики гастрита, гастроэнтерита или эзофагита. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных терапевтических агентов для лечения или профилактики гастрита, гастроэнтерита или эзофагита выбраны из группы, состоящей из PPI, системных кортикостероидов, местных кортикостероидов, антигистаминных препаратов, стабилизаторов тучных клеток, H-2 блокаторов, анти-IgE антител, ингибиторов кальциневрина, иммуномодуляторов и иммунодепрессантов. В некоторых вариантах осуществления, индивидуум является человеком. В некоторых вариантах осуществления, композицией является фармацевтическая композиция, содержащая антитело и фармацевтически приемлемый носитель.

Другие аспекты настоящего описания относятся к готовым изделиям или наборам, содержащим лекарственное средство, содержащее композицию, содержащую антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, и вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению лекарственного средства индивидууму, нуждающемуся в этом, в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления. Другие аспекты настоящего описания относятся к готовым изделиям или наборам, содержащим лекарственное средство, содержащее антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, и вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению лекарственного средства индивидууму, нуждающемуся в этом, в соответствии с любым из вышеперечисленных вариантов осуществления.

Следует понимать, что одно, некоторые или все свойства различных вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, могут быть объединены для формирования других вариантов осуществления настоящего описания. Эти и другие аспекты настоящего описания станут очевидными для специалиста в данной области техники. Эти и другие варианты осуществления настоящего описания дополнительно описаны в подробном описании, которое следует ниже.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На **фиг. 1** представлена схематическая диаграмма, иллюстрирующая патогенез эозинофильных желудочно-кишечных заболеваний (EGID).

На **фиг. 2А и 2В** показано распределение (**фиг. 2А**) и исходные характеристики (**фиг. 2В**) симптоматических пациентов с подозрением на EG/EEp, которые не соответствовали гистопатологическим критериям включения для эозинофилии слизистых оболочек для исследования фазы 2 анти-Siglec-8 антитела у пациентов с EG/EEp. На **фиг. 2В**, <sup>a</sup>=анамнез при скрининге астмы, ринита, пищевой аллергии, атопического дерматита, сезонной аллергии, экологической аллергии или аллергии на пыльцу.

На **фиг. 3А и 3В** показано, что количество тучных клеток постоянно увеличивается в биопсиях желудка (**фиг. 3А**) и двенадцатиперстной кишки (**фиг. 3В**) у симптоматических пациентов. Горизонтальная штриховка указывает на нормальные уровни тучных клеток (*см., например, Hahn et al. (2007) Am. J. Surg. Pathol. 31:1669-1676; Tison et al. (2010) J. Allergy Clin. Immunol. 125:AB182; Walker et al. (2009) Aliment. Pharmacol. Ther. 29:765-773; Martinez et al. (2013) Gut 62:1160-1168; и Doyle et al. (2014) Am. J. Surg. Pathol. 38:832-843*).

На **фиг. 4** показана средняя интенсивность симптомов (0-10) во время скрининга для каждого из 8 симптомов для пациентов с  $\geq 30$  эозинофилов/HPF ( $n=71$ ; светлые) или пациентов с  $< 30$  эозинофилов/HPF, но  $\geq 30$  тучных клеток/HPF ( $n=16$ ; темные). В когорте с  $\geq 30$  эозинофилов/HPF у одного пациента отсутствовали данные о симптомах, и он не был включен в исследование.

На **фиг. 5А и 5В** показаны два индивидуальных исследования пациентов.

На **фиг. 6А и 6В** показано, что повышенная активация тучных клеток наблюдается в тканях, в которых повышены только тучные клетки (а не эозинофилы). На **фиг. 6А**, ткань биопсии желудка человека обрабатывают до отдельных клеток с последующей количественной оценкой тучных клеток (CD117+ Siglec-8+) и эозинофилов (CD117- Siglec-8+) проточной цитометрией. На **фиг. 6В**, тучные клетки, идентифицированные на **фиг. 6А** были дополнительно проанализированы на активацию и дегрануляцию маркера CD63 проточной цитометрией. Показано окрашивание антителом, специфичным к CD63, или контрольным антителом.

На **фиг. 7** показано среднее и медианное изменение общей оценки симптомов от исходного уровня (среднесуточное значение периода скрининга) до средней суточной оценки в течение двух недель после последней дозы анти-Siglec-8 антитела.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

### I. Определения

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными композициями или биологическими системами, которые могут, конечно, варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения. В этом описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают в себя ссылки во множественном числе, если содержание явно не указывает иное. Таким образом, например, ссылка на «молекулу» необязательно содержит комбинацию двух или более таких молекул и подобное.

Термин «примерно», используемый в настоящем описании, относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, хорошо известного специалисту в данной области техники. Ссылка на «примерное» значение или параметр в настоящем документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые связаны с этим значением или параметром как таковые.

Следует понимать, что аспекты и варианты осуществления настоящего описания включают «содержащие», «состоящие» и «состоящие по существу из» аспекты и варианты осуществления.

Термин «антитело» включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (включая полноразмерные антитела, которые имеют Fc область иммуноглобулина), композиции антител с полиэпитопной специфичностью, мультиспецифические антитела (*например*, биспецифические антитела, диатела и одноцепочечные молекулы), а также фрагменты антител (*например*, Fab, F(ab')<sub>2</sub> и Fv). Термин «иммуноглобулин» (Ig) используется в настоящем документе взаимозаменяемо с «антителом».

Основная 4-цепочечная единица антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. IgM антитело состоит из 5 основных гетеротетрамерных единиц вместе с дополнительным полипептидом, называемым J цепью, и содержит 10 антигенсвязывающих сайтов, в то время как IgA антитела содержат от 2 до 5 основных 4-цепочечных единиц, которые могут полимеризоваться с образованием поливалентных сборок в сочетании с J цепью. В случае IgG, 4-цепочечная единица обычно составляет примерно 150000 дальтонов. Каждая L цепь связана с H цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как две H цепи связаны друг с другом одной или несколькими дисульфидными связями в зависимости от изоформа H цепи. Каждая H и L цепь также имеет регулярно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая H цепь имеет на N-конце, переменный домен (V<sub>H</sub>), затем три константных домена (C<sub>H</sub>) для каждой из α и γ цепей и четыре C<sub>H</sub> домена для μ и ε изоформ. Каждая L цепь имеет на N-конце переменный домен (V<sub>L</sub>), затем константный домен на другом конце. V<sub>L</sub> выровнен с V<sub>H</sub>, а C<sub>L</sub> выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи (C<sub>H1</sub>). Считается, что определенные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи. Спаривание V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> вместе образует единый антигенсвязывающий сайт. О структуре и свойствах различных классов антител см., *например*, Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, страница 71 и глава 6.

L цепь любого вида позвоночных может быть отнесена к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа и лямбда, на основе аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (CH), иммуноглобулины можно отнести к разным классам или изоформам. Существует пять классов

иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющих тяжелые цепи, обозначенные  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ , соответственно.  $\gamma$  и  $\alpha$  классы далее разделены на подклассы на основе относительно незначительных различий в последовательности и функции СН, *например*, люди экспрессируют следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. IgG1 антитела могут существовать во множестве полиморфных вариантов, называемых аллотипами (рассматриваются в Jefferis and Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4 1-7), любой из которых подходит для использования в настоящем описании. Общие аллотипические варианты в человеческих популяциях обозначаются буквами a, f, n, z.

Термин «выделенное» антитело относится к антителу, которое было идентифицировано, выделено и/или извлечено из компонента его продуцирующей среды (*например*, естественно или рекомбинантно). В некоторых вариантах осуществления, выделенный полипептид не связан со всеми другими компонентами его продуцирующей среды. Загрязняющие компоненты его продуцирующей среды, например, такие, которые получены из рекомбинантных трансфицированных клеток, представляют собой материалы, которые обычно мешают исследованиям, диагностике или терапевтическому применению антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или не белковые растворенные вещества. В некоторых вариантах осуществления, полипептид очищают: (1) до более чем 95% массовых антитела, как определено, например, способом Лоури, а в некоторых вариантах осуществления, до более чем 99% массовых; (1) до степени, достаточной для получения, по меньшей мере, 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности с помощью SDS-PAGE в не восстанавливающих или восстанавливающих условиях с использованием окрашивания Coomassie синим или серебряным. Выделенное антитело содержит антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку, по меньшей мере, один компонент естественной среды антитела не будет присутствовать. Однако, обычно выделенный полипептид или антитело получают, по меньшей мере, с помощью одной стадии очистки.

Термин «моноклональное антитело» в настоящем документе относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, *т.е.* отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций и/или посттрансляционных модификаций (*например*, изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах. В некоторых вариантах осуществления, моноклональные антитела имеют C-концевое расщепление на тяжелой цепи и/или легкой цепи. Например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков отщепляются на C-конце тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления, C-концевое расщепление удаляет C-концевой лизин из тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления, моноклональные антитела имеют N-концевое расщепление на тяжелой цепи и/или легкой цепи. Например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков отщепляются на N-конце тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления, моноклональные антитела являются

высокоспецифичными, направленными против одного антигенного сайта. В некоторых вариантах осуществления, моноклональные антитела являются высокоспецифичными, направленными против множества антигенных сайтов (например, биспецифическое антитело или мультиспецифическое антитело). Модификатор «моноклональное» указывает на характер антитела как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует истолковывать как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, применяемые в соответствии с настоящим описанием, могут быть получены различными методами, включая, например, метод гибридомы, методы рекомбинантной ДНК, технологии фагового дисплея и технологии получения человеческих или человекоподобных антител у животных, которые имеют части или все локусы иммуноглобулина человека или гены, кодирующие последовательности иммуноглобулина человека.

Термин «голое антитело» относится к антителу, которое не конъюгировано с цитотоксической группой или радиоактивной меткой.

Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» или «целое антитело» используются взаимозаменяемо для обозначения антитела в его по существу интактной форме, в отличие от фрагмента антитела. В частности, полные антитела включают антитела с тяжелой и легкой цепями, включая Fc область. Константные домены могут быть константными доменами с нативной последовательностью (*например*, константными доменами с нативной последовательностью человека) или ее вариантами аминокислотной последовательности. В некоторых случаях, интактное антитело может выполнять одну или несколько эффекторных функций.

Термин «фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, антигенсвязывающую и/или переменную область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv; диатела; линейные антитела (см. патент США № 5,641,870, пример 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Папаиновый перевар антител дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых «Fab» фрагменты, и остаточный «Fc» фрагмент, где обозначение отражает способность легко кристаллизоваться. Fab фрагмент состоит из полной L цепи вместе с доменом переменной области H цепи (V<sub>H</sub>) и первым константным доменом одной тяжелой цепи (C<sub>H1</sub>). Каждый Fab фрагмент является одновалентным в отношении связывания антигена, *т.е.* он имеет единственный антигенсвязывающий сайт. Обработка антитела пепсином дает один большой F(ab')<sub>2</sub> фрагмент, который примерно соответствует двум связанным дисульфидам Fab фрагментам, имеющим разную антигенсвязывающую активность и все еще способным к перекрестному связыванию антигена. Fab' фрагменты отличаются от Fab фрагментов наличием нескольких дополнительных остатков на карбокси конце домена C<sub>H1</sub>, включая один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH является обозначением в настоящем документе для Fab', в

котором цистеиновые остатки константных доменов несут свободную тиольную группу.  $F(ab')_2$  фрагменты антитела первоначально были продуцированы как пары фрагментов  $Fab'$ , между которыми имеются шарнирные цистеины. Также известны другие химические сочетания фрагментов антител.

$F_c$  фрагмент содержит карбокси-концевые части обеих  $H$  цепей, удерживаемых вместе дисульфидами. Эффекторные функции антител определяются последовательностями в  $F_c$  области, области, которая также распознается  $F_c$  рецепторами ( $F_cR$ ), обнаруженными на определенных типах клеток.

« $F_v$ » является минимальным фрагментом антитела, который содержит полный антигенраспознающий и -связывающий сайт. Этот фрагмент состоит из димера домена переменной области одной тяжелой и одной легкой цепей в тесной нековалентной связи. В результате сворачивания этих двух доменов образуются шесть гипервариабельных петель (по 3 петли от каждой,  $H$  и  $L$  цепи), которые отдают аминокислотные остатки для связывания антигена и придают антителу антигенсвязывающую специфичность. Однако даже один переменной домен (или половина  $F_v$ , содержащая только три HVR, специфичных для антигена) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем весь сайт связывания.

«Одноцепочечные  $F_v$ », также сокращенно обозначаемые как « $sF_v$ » или « $scF_v$ » фрагменты антител, которые содержат домены  $V_H$  и  $V_L$  антитела, соединенные в одну полипептидную цепь. В некоторых вариантах осуществления,  $sF_v$  полипептид дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами  $V_H$  и  $V_L$ , который позволяет  $sF_v$  формировать желаемую структуру для связывания антигена. Для обзора  $sF_v$  см. Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

«Функциональные фрагменты» антител по настоящему изобретению включают часть интактного антитела, обычно включающую антигенсвязывающую или переменную область интактного антитела или  $F_v$  область антитела, которая сохраняет или имеет модифицированную способность связывания  $F_cR$ . Примеры фрагментов антител включают линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Моноклональные антитела в настоящем документе, в частности, включают «химерные» антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от определенного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи(ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность (патент США № 4,816,567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)).

Химерные антитела, представляющие интерес в настоящем документе, включают PRIMATIZED® антитела, где антигенсвязывающую область антитела получают из антитела, продуцируемого, *например*, макаками, иммунизированными представляющим интерес антигеном. В настоящем контексте «гуманизированное антитело» используется как подмножество «химерных антител».

«Гуманизированные» формы не человеческих (*например*, мыши) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из не человеческого иммуноглобулина. В одном варианте осуществления, гуманизированным антителом является иммуноглобулин человека (реципиентное антитело), в котором остатки из HVR реципиента заменены остатками из HVR не относящегося к человеку вида (донорское антитело), такого как мышь, крыса, кролик или примат, отличающийся от человека, обладающего желаемой специфичностью, аффинностью и/или способностью. В некоторых случаях, FR остатки иммуноглобулина человека заменяются соответствующими остатками не человека. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которых нет в антителереципиенте или в антителе-доноре. Эти модификации могут быть сделаны для дальнейшего улучшения характеристик антител, таких как аффинность связывания. В общем, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из, по меньшей мере, одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все гиперпеременные петли соответствуют таковым последовательности иммуноглобулина не человеческого происхождения, и все или по существу все из FR областей являются участками последовательности иммуноглобулина человека, хотя области FR могут включать одну или несколько индивидуальных замен FR остатков, которые улучшают характеристики антитела, такие как аффинность связывания, изомеризация, иммуногенность и *т. д.* В некоторых вариантах осуществления, количество этих аминокислотных замен в FR составляет не более 6 в H цепи, а в L цепи не более 3. Гуманизированное антитело необязательно также содержит, по меньшей мере, часть константной области (Fc) иммуноглобулина, обычно иммуноглобулина человека. Для получения дополнительных подробностей см., *например*, Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); и Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). См. также, например, Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994); и патент США. №№ 6,982,321 и 7,087,409. В некоторых вариантах осуществления, гуманизированные антитела направлены против одного антигенного сайта. В некоторых вариантах осуществления, гуманизированные антитела направлены против нескольких антигенных сайтов. Альтернативный способ гуманизации описан в патенте США. № 7,981,843 и публикации заявки на патент США № 2006/0134098.

«Переменная область» или «переменный домен» антитела относится к аминоконцевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Переменные домены

тяжелой цепи и легкой цепи можно обозначать как «VH» и «VL» соответственно. Эти домены обычно являются наиболее вариабельными частями антитела (по сравнению с другими антителами того же класса) и содержат антигенсвязывающие сайты.

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

Множество описаний HVR используется и охвачен в настоящем документе. HVR, которые являются определяющими комплементарными областями (CDR) по Kabat, основаны на вариабельности последовательностей и являются наиболее часто используемыми (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). HVR Chothia, вместо этого, относятся к местоположению структурных петель (Chothia and Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). «Контактные» HVR основаны на анализе имеющихся сложных кристаллических структур. Остатки каждой из этих HVR указаны ниже.

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

Если не указано иначе, остатки вариабельного домена (HVR остатки и остатки каркасной области) пронумерованы в соответствии с Kabat et al., *выше*.

«Каркасные» или «FR» остатками являются такие остатка вариабельного домена, отличные от HVR остатков, как определено в настоящем описании.

Выражение «нумерация остатков вариабельных доменов по Kabat» или «нумерация аминокислотных положений по Kabat» и их варианты, относится к системе нумерации, используемой для вариабельных доменов тяжелой цепи или вариабельных доменов легкой цепи компиляции антител в Kabat et al., *выше*. При использовании этой системы

нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению или вставке в FR или HVR переменного домена. Например, переменный домен тяжелой цепи может включать вставку одной аминокислоты (остаток 52a по Kabat) после остатка 52 H2 и вставленные остатки (*например*, остатки 82a, 82b и 82c и *т.д.* по Kabat) после FR остатка тяжелой цепи 82. Нумерация остатков по Kabat может быть определена для данного антитела путем выравнивания областей гомологии последовательности антитела со «стандартной» пронумерованной по Kabat последовательностью.

«Акцепторная каркасная область человека» для целей настоящего описания представляет собой каркасную область, содержащую аминокислотную последовательность каркасной области VL или VH, полученную из каркасной области иммуноглобулина человека или консенсусной каркасной области человека. Акцепторная каркасная область человека, «происходящая из» каркасной области иммуноглобулина человека или консенсусной каркасной области человека, может содержать такую же аминокислотную последовательность, или она может содержать ранее существовавшие замены аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, количество ранее существовавших аминокислотных замен составляет 10 или меньше, 9 или меньше, 8 или меньше, 7 или меньше, 6 или меньше, 5 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше или 2 или меньше.

«Доля (%) идентичности аминокислотной последовательности» по отношению к эталонной полипептидной последовательности определяется как доля аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательности и введения гэпов, если необходимо, для достижения максимальной доли идентичности последовательностей и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание для определения доли идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые известны специалистам в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Например, % идентичности аминокислотной последовательности данной аминокислотной последовательности А к, с или против данной аминокислотной последовательности В (которая альтернативно может быть сформулирована как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности по отношению к, с или против данной аминокислотной последовательности В) рассчитывается следующим образом:

100 умножить на дробь X/Y

где X является количеством аминокислотных остатков, оцененных как идентичные совпадения последовательности в программном выравнивании A и B, и где Y является общим количеством аминокислотных остатков в B. Следует понимать, что там, где длина аминокислотной последовательности A не равна длине аминокислотной последовательности B, % идентичности аминокислотной последовательности A к B не будет равняться % идентичности аминокислотной последовательности B к A.

Антитело, которое «связывается с», «специфически связывается с» или «специфично к» определенному полипептиду или эпитопу на определенном полипептиде является таким, которое связывается с определенным полипептидом или эпитопом на определенном полипептиде без по существу связывания с любым другим полипептидом или полипептидным эпитопом. В некоторых вариантах осуществления, связывание описанного в настоящем документе анти-Siglec-8 антитела (*например*, антитела, которое связывается с Siglec-8 человека) с неродственным, не-Siglec-8 полипептидом, составляет менее примерно 10% от связывания антитела с Siglec-8, по данным способов, известных в данной области техники (*например*, иммуноферментного анализа (ELISA)). В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 (*например*, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека) имеет константу диссоциации ( $K_d$ )  $\leq 1$  мкМ,  $\leq 100$  нМ,  $\leq 10$  нМ,  $\leq 2$  нМ,  $\leq 1$  нМ,  $\leq 0,7$  нМ,  $\leq 0,6$  нМ,  $\leq 0,5$  нМ,  $\leq 0,1$  нМ,  $\leq 0,01$  нМ или  $\leq 0,001$  нМ (*например*,  $10^{-8}$  М или менее, *например*, от  $10^{-8}$  М до  $10^{-13}$  М, *например*, от  $10^{-9}$  М до  $10^{-13}$  М).

Термин «анти-Siglec-8 антитело» или «антитело, которое связывается с Siglec-8 человека» относится к антителу, которое связывается с полипептидом или эпитопом Siglec-8 человека без существенного связывания с любым другим полипептидом или эпитопом неродственного не-Siglec-8 полипептида.

Термин «Siglec-8» в настоящем документе, относится к человеческому белку Siglec-8. Термин также включает встречающиеся в природе варианты Siglec-8, включая варианты сплайсинга или аллельные варианты. Аминокислотная последовательность типового Siglec-8 человека представлена в SEQ ID NO: 72. Аминокислотная последовательность другого типового Siglec-8 человека представлена в SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления, белок Siglec-8 человека содержит внеклеточный домен Siglec-8 человека, слитый с Fc областью иммуноглобулина. Аминокислотная последовательность типового внеклеточного домена Siglec-8 человека, слитого с Fc областью иммуноглобулина, показана в SEQ ID NO: 74. Аминокислотная последовательность, подчеркнутая в SEQ ID NO: 74, указывает на Fc область аминокислотной последовательности Fc слитого белка Siglec-8.

Аминокислотная последовательность Siglec-8 человека

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPSCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDRPYQDAP  
VATNPNPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGS MKWSYK  
SQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHSRNLTCVWPWACKQGTTPPMISWIGASV  
SSPGPTTARSSVLTLPKPKQDHGTS LTCQVTLP GTGVTTTSTVRLDVS YPPWNLTMTVFAQ

GDATASTALGNSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELP  
RVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFL  
SFCIIFIVRSCRKKSARPAAGVGDGTMEDAKAIRGSASQGPLTESWKDGNPLKKPPPAV  
APSSGEEGELHYATLSFHKVKPQDPQGQEATDSEYSEIKIHKRETAETQAACLRNHNPPSSK  
EVRG (SEQ ID NO:72)

Аминокислотная последовательность Siglec-8 человека

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSPYQDGWTDSDPVHGYWFRAGDRPYQDAP  
VATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIVSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGS MKWSYK  
SQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHPRNLTCSVPWACKQGTPPMISWIGASV  
SSPGPTTARSSVLTLPKPQDHGTS LTCQVTLPGTGVT TTTSTVRLDVS YPPWNLTMTVFQ  
GDATASTALGNSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELP  
RVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFL  
SFCIIFIVRSCRKKSARPAAGVGDGTMEDAKAIRGSASQGPLTESWKDGNPLKKPPPAV  
APSSGEEGELHYATLSFHKVKPQDPQGQEATDSEYSEIKIHKRETAETQAACLRNHNPPSSK  
EVRG (SEQ ID NO:73)

Аминокислотная последовательность Fc слитого белка Siglec-8

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSPYQDGWTDSDPVHGYWFRAGDRPYQDAP  
VATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIVSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGS MKWSYK  
SQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHSRNLTCVPWACKQGTPPMISWIGASV  
SSPGPTTARSSVLTLPKPQDHGTS LTCQVTLPGTGVT TTTSTVRLDVS YPPWNLTMTVFQ  
GDATASTALGNSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELP  
RVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGIEGRSDKTH  
TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:74)

Антителами, которые «индуцируют апоптоз» или являются «апоптотическими» являются такие, которые индуцируют запрограммированную смерть клеток, как определено стандартными апоптозными анализами, таких как связывание аннексина V, фрагментация ДНК, сжатие клетки, дилатация эндоплазматического ретикулума, клеточная фрагментация и/или образование мембранных везикул (называемых апоптотическими тельцами). Например, апоптотическая активность анти-Siglec-8 антител (*например*, антитела, которое связывается с Siglec-8 человека) настоящего описания может быть показана через окрашивание клеток аннексином V.

«Эффекторные функции» антитела относятся к такой биологической активности, которая относится к Fc области (Fc области нативной последовательности или Fc области варианта аминокислотной последовательности) антитела, и изменяются в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность; связывание Fc рецептора; антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; подавление рецепторов

клеточной поверхности (*например*, рецепторов В-клеток); и активация В-клеток.

«Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность» или «ADCC» относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig связывается с Fc рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (*например*, естественных киллерах (NK), нейтрофилах и макрофагах), позволяя этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с несущей антиген клеткой-мишенью и впоследствии убивать эту клетку-мишень цитотоксинами. Антитела «вооружают» цитотоксические клетки и необходимы для уничтожения клетки-мишени с помощью этого механизма. Первичные клетки для опосредования ADCC, NK клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия Fc на гемопоэтических клетках суммирована в таблице 3 на стр. 464 из Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991). В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело (*например*, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), описанное в настоящем документе, усиливает ADCC. Чтобы оценить активность ADCC молекулы, представляющей интерес, может быть проведен *in vitro* анализ ADCC, такой как описан в патентах США № 5,500,362 или 5,821,337. Полезные эффекторные клетки для таких анализов включают моноклеарные клетки периферической крови (PBMC) и естественные киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно, ADCC активность молекулы, представляющей интерес, может быть оценена *in vivo*, *например*, на животной модели, такой как описана у Clynes et al., PNAS USA 95:652-656 (1998). Другие варианты Fc, которые изменяют активность ADCC и другие свойства антител, включают варианты, описанные у Ghetie et al., Nat Biotech. 15:637-40, 1997; Duncan et al, Nature 332:563-564, 1988; Lund et al., J. Immunol 147:2657-2662, 1991; Lund et al, Mol Immunol 29:53-59, 1992; Alegre et al, Transplantation 57:1537-1543, 1994; Hutchins et al., Proc Natl. Acad Sci USA 92:11980-11984, 1995; Jefferis et al, Immunol Lett. 44:111-117, 1995; Lund et al., FASEB J9:115-119, 1995; Jefferis et al, Immunol Lett 54:101-104, 1996; Lund et al, J Immunol 157:4963-4969, 1996; Armour et al., Eur J Immunol 29:2613-2624, 1999; Idusogie et al, J Immunol 164:4178-4184, 2000; Reddy et al, J Immunol 164:1925-1933, 2000; Xu et al., Cell Immunol 200:16-26, 2000; Idusogie et al, J Immunol 166:2571-2575, 2001; Shields et al., J Biol Chem 276:6591-6604, 2001; Jefferis et al, Immunol Lett 82:57-65. 2002; Presta et al., Biochem Soc Trans 30:487-490, 2002; Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005-4010, 2006; патентах США №№ 5,624,821; 5,885,573; 5,677,425; 6,165,745; 6,277,375; 5,869,046; 6,121,022; 5,624,821; 5,648,260; 6,194,551; 6,737,056; 6,821,505; 6,277,375; 7,335,742; и 7,317,091.

Термин «Fc область» в настоящем описании используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая Fc области нативной последовательности и варианты Fc области. Хотя границы Fc области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, Fc область тяжелой цепи IgG человека обычно определяется как простирающаяся от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до его карбоксильного конца. Подходящие Fc области нативной

последовательности для использования в антителах по настоящему описанию включают IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека. Для устранения гетерогенности, наблюдаемой в рекомбинантном антителе IgG4, может быть введена единственная аминокислотная замена (S228P по нумерации Kabat; обозначенная как IgG4Pro). См. Angal, S. et al. (1993) Mol Immunol 30, 105-108.

«Не фукозилированное» или «фукоза-дефицитное» антитело относится к варианту гликозилирования антитела, содержащему Fc область, в котором углеводная структура, прикрепленная к Fc области, имеет пониженную фукозу или не имеет фукозу. В некоторых вариантах осуществления, антитело с пониженным содержанием фукозы или не имеющее фукозу имеет улучшенную функцию ADCC. Не фукозилированные или фукоза-дефицитные антитела имеют пониженную фукозу по сравнению с количеством фукозы на том же антителе, продуцируемом в клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления, композиция не фукозилированного или фукоза-дефицитного антитела, рассматриваемая в настоящем документе, представляет собой композицию, в которой менее примерно 50% N-связанных гликанов, прикрепленных к Fc области антител в композиции, содержат фукозу.

Термины «фукозилирование» или «фукозилированное» относится к присутствию фукозных остатков в олигосахаридах, прикрепленных к пептидному скелету антитела. В частности, фукозилированное антитело содержит  $\alpha$  (1,6)-связанную фукозу в самом внутреннем остатке N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) в одном или обоих N-связанных олигосахаридах, прикрепленных к Fc области антитела, например, в положении Asn 297 Fc домена IgG1 человека. (EU нумерация остатков Fc области). Asn297 также может располагаться примерно +3 аминокислоты выше или ниже положения 297, то есть между положениями 294 и 300, из-за незначительных вариаций последовательности в иммуноглобулинах.

«Степень фукозилирования» представляет собой долю фукозилированных олигосахаридов по отношению ко всем олигосахаридам, идентифицированным способами, известными в данной области техники, *например*, в композиции антитела, обработанной N-гликозидазой F, оцениваемую времяпролетной масс-спектрометрией с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF MS). В композиции «полностью фукозилированного антитела» по существу всех олигосахариды содержат фукозные остатки, *т. е.* фукозилированы. В некоторых вариантах осуществления, композиция полностью фукозилированного антитела имеет степень фукозилирования, по меньшей мере, примерно 90%. Соответственно, индивидуальное антитело в такой композиции обычно содержит фукозные остатки в каждом из двух N-связанных олигосахаридов в Fc области. Напротив, в композиции «полностью не фукозилированного» антитела по существу ни один из олигосахаридов не фукозилирован, и отдельное антитело в такой композиции не содержит фукозные остатки ни в одном из двух N-связанных олигосахаридов в Fc области. В некоторых вариантах осуществления, композиция полностью не фукозилированного антитела имеет степень фукозилирования

менее чем примерно 10%. В композиции «частично фукозилированного антитела» только часть олигосахаридов содержит фукозу. Отдельное антитело в такой композиции может содержать фукозные остатки ни в одном, в одном или обоих N-связанных олигосахаридах в Fc области, при условии, что композиция не содержит ни по существу все отдельные антитела, в которых отсутствуют фукозные остатки в N-связанных олигосахаридах в Fc области, ни по существу все отдельные антитела, которые содержат фукозные остатки в обоих N-связанных олигосахаридах в Fc области. В одном варианте осуществления, композиция частично фукозилированного антитела имеет степень фукозилирования от примерно 10% до примерно 80% (*например*, от примерно 50% до примерно 80%, от примерно 60% до примерно 80% или от примерно 70% до примерно 80%).

«Аффинность связывания» в настоящем описании относится к силе нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (*например*, антитела) и ее партнером по связыванию (*например*, антигеном). В некоторых вариантах осуществления, аффинность связывания антитела для Siglec-8 (который может быть димером, например, слитый белок Siglec-8-Fc, описанный в настоящем документе) в общем может быть представлена в виде константы диссоциации (Kd). Аффинность может быть измерена обычными способами, известными в данной области техники, включая описанные в настоящем документе.

«Авидность связывания» в настоящем описании относится к силе связывания множества сайтов связывания молекулы (*например*, антитела) и ее партнера по связыванию (*например*, антигена).

«Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитела в настоящем документе, является молекулой нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена, по меньшей мере, от одной загрязняющей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в окружающей среде, в которой она была продуцирована. В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота не связана со всеми компонентами, связанными со средой продуцирования. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды и антитела в настоящем документе, находятся в форме, отличной от формы или устройства, в которой они встречаются в природе. Таким образом, выделенные молекулы нуклеиновой кислоты отличаются от нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды и антитела, которые в настоящем документе естественным образом присутствуют в клетках.

Термин «фармацевтический состав» относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы позволить биологической активности активного ингредиента быть эффективной, и которая не содержит дополнительные компоненты, которые являются неприемлемо токсичными для индивидуума, которому предполагается вводить состав. Такие составы являются стерильными.

«Носители» в настоящем описании включают фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы, которые нетоксичны для клетки или млекопитающего, подвергающегося их воздействию, в используемых дозировках и

концентрациях. Часто физиологически приемлемым носителем является водный рН-буферированный раствор. Примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; полипептид с низкой молекулярной массой (менее примерно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONICS™.

Используемый в настоящем документе термин «лечение» или «лечить» относится к клиническому вмешательству, предназначенному для изменения естественного курса индивидуума или клетки, подвергаемых лечению, в ходе клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или смягчение болезненного состояния, а также ремиссию или улучшение прогноза. Индивидуума успешно «лечат», например, если один или несколько симптомов, связанных с заболеванием (*например*, тучноклеточным гастритом, тучноклеточным эзофагитом, тучноклеточным колитом, тучноклеточным энтеритом и/или тучноклеточным гастроэнтеритом) смягчены или устранены. Например, индивидуума успешно «лечат», если лечение приводит к повышению качества жизни тех, которые страдают от заболевания, уменьшению дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, уменьшению частоты рецидивов заболевания, уменьшению тяжести заболевания, задержке развития или прогрессирования заболевания и/или продлению выживания индивидуумов.

В настоящем документе «в сочетании с» или «в комбинации с» относятся к введению одного лечебного средства в дополнение к другому лечебному средству. Как таковые, «в сочетании с» или «в комбинации с» относится к введению одного лечебного средства до, во время или после введения другого лечебного средства индивидууму.

В настоящем документе термин «профилактика» или «предотвращать» включает обеспечение профилактики в отношении возникновения или рецидива заболевания у индивидуума. Индивидуум может быть предрасположен к заболеванию, быть восприимчивым к заболеванию или иметь риск развития заболевания, но у него еще не было диагностировано заболевание. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитела (*например*, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), описанные в настоящем документе, используются для задержки развития заболевания (*например*, тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного колита, тучноклеточного энтерита и/или тучноклеточного гастроэнтерита).

В настоящем документе, индивидуум «с риском» развития заболевания (*например*, тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного колита,

тучноклеточного энтерита и/или тучноклеточного гастроэнтерита ) может иметь или не иметь выявляемое заболевание или симптомы заболевания, и может или не может проявлять выявляемое заболевание или симптомы заболевания до способов лечения, описанных в настоящем документе. «В группе риска» означает, что у человека есть один или несколько факторов риска, которые являются измеряемыми параметрами, которые коррелируют с развитием заболевания (*например*, тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного колита, тучноклеточного энтерита и/или тучноклеточного гастроэнтерита), как известно в данной области техники. Индивидуум, имеющий один или несколько из этих факторов риска, имеет более высокую вероятность развития заболевания, чем индивидуум без одного или нескольких из этих факторов риска.

«Эффективное количество» относится к, по меньшей мере, количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого или указанного эффекта, включая терапевтический или профилактический результат. Эффективное количество может быть введено за одно или несколько введений. «Терапевтически эффективное количество» является, по меньшей мере, минимальной концентрацией, необходимой для достижения измеримого улучшения конкретного заболевания. В настоящем документе, терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и масса тела пациента, а также способность антитела вызывать желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективным количеством также может быть такое, при котором любые токсические или вредные эффекты антитела перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата. Обычно, но не обязательно, поскольку профилактическая доза используется у индивидуумов до или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество может быть меньше терапевтически эффективного количества.

«Хроническое» введение относится к введению лекарственных средств в непрерывном, в отличие от острого, режиме, чтобы поддерживать начальный терапевтический эффект (активность) в течение продолжительного периода времени. «Прерывистым» введением является лечение, которое не проводится последовательно без перерывов, а скорее носит циклический характер.

Термин «вкладыш в упаковку» используется для обозначения инструкций, обычно вкладываемых в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предостережений относительно использования таких терапевтических продуктов.

В контексте настоящего описания «индивидуумом» или «субъектом» является млекопитающее. «Млекопитающее» для целей лечения включает людей, домашних и

сельскохозяйственных животных, а также животных из зоопарков, спортивных или домашних питомцев, таких как собаки, лошади, кролики, крупный рогатый скот, свиньи, хомяки, песчанки, мыши, хорьки, крысы, кошки и *т. д.* В некоторых вариантах осуществления, индивидуумом или субъектом является человек.

## **II. Способы**

В настоящем документе представлены способы лечения и/или профилактики тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного энтерита, тучноклеточного колита и/или тучноклеточного гастроэнтерита у индивидуума, включающие введение индивидууму эффективного количества описанного в настоящем документе антитела, которое связывается с Siglec-8 человека (*например*, анти-Siglec-8 антитела) или композиций, содержащих указанные антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело находится в фармацевтической композиции, содержащей антитело и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления, индивидуум является человеком. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума имеется тучноклеточный гастрит. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума имеется тучноклеточный эзофагит. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума имеется тучноклеточный энтерит. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума имеется тучноклеточный гастроэнтерит. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума имеется тучноклеточный гастрит и тучноклеточный гастроэнтерит. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума имеется тучноклеточный гастрит и тучноклеточный энтерит. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума имеется тучноклеточный эзофагит и тучноклеточный гастрит. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума имеется тучноклеточный эзофагит и тучноклеточный гастроэнтерит. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума имеется тучноклеточный эзофагит и тучноклеточный энтерит. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума имеется тучноклеточный эзофагит, тучноклеточный гастрит и тучноклеточный гастроэнтерит. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума имеется тучноклеточный эзофагит, тучноклеточный гастрит и тучноклеточный энтерит.

В некоторых вариантах осуществления, способы включают обнаружение количества тучных клеток и количества эозинофилов из одного или нескольких образцов, полученных из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки индивидуума (*например*, при тучноклеточном гастрите или тучноклеточном гастроэнтерите). В некоторых вариантах осуществления, способы включают обнаружение количества тучных клеток и количества эозинофилов из одного или нескольких образцов, полученных из слизистой оболочки пищевода индивидуума (*например*, при тучноклеточном эзофагите).

*А. Тучноклеточный гастрит, тучноклеточный эзофагит, тучноклеточный колит, тучноклеточный энтерит, тучноклеточный дуоденит и/или тучноклеточный гастроэнтерит*

Некоторые аспекты настоящего описания относятся к индивидуумам с тучноклеточным гастритом, тучноклеточным эзофагитом, тучноклеточным колитом, тучноклеточным энтеритом, тучноклеточным дуоденитом и/или тучноклеточным гастроэнтеритом. Настоящее описание основано, по меньшей мере, частично, на открытии того, что субпопуляция пациентов в клиническом исследовании, несмотря на наличие симптомов эозинофильного гастрита/гастроэнтерита, не имела повышенного количества эозинофилов в слизистой оболочке желудка и/или двенадцатиперстной кишки, обычно используемого для диагностики эозинофильного гастрита/гастроэнтерита. Вместо этого было обнаружено, что у этих пациентов было значительное количество тучных клеток (в большинстве случаев более 30 тучных клеток/поле зрения (HPF)) в слизистой оболочке желудка и/или двенадцатиперстной кишки. Нормальные уровни были измерены и составляют примерно менее 20 тучных клеток/HPF (Doyle et al., Am. J. Surg. Pathol. (2014) 38:832-843; Jakate et al., Arch. Pathol. Lab. Med. (2006) 130:362-367; Tison et al., Allergy Clin. Immunol. (2010) Abstract 714), подразумевая, что повышенные тучные клетки у этих пациентов могут быть ответственны за желудочно-кишечную симптоматику.

В некоторых вариантах осуществления у индивидуума имеется или диагностирована гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (GERD) (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом). В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума имеется или диагностирована гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (GERD) (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом), и он невосприимчив к лечению антацидом, блокатором H<sub>2</sub> и/или ингибитор протонной помпы. Например, один или несколько симптомов GERD у человека могут быть невосприимчивыми к лечению антацидом, блокатором H<sub>2</sub> и/или ингибитором протонной помпы, или у человека может быть GERD, не поддающаяся лечению антацидом, блокатором H<sub>2</sub> и/или ингибитором протонной помпы. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума есть или был диагностирован синдром раздраженного кишечника (IBS) (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом). В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума ранее был или был диагностирован (*например*, в анамнезе) эозинофильный гастрит, но у него имеются симптомы без повышенных эозинофилов (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом). В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума был (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом) или ранее был диагностирован (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом) один или несколько из: боли в животе, спазмов в животе, тошноты, рвоты, диареи, вздутия живота и раннего насыщения без установления причины. В некоторых вариантах осуществления, индивидуум (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом) не поддается лечению и/или невосприимчив к фармакологическому и/или диетическому вмешательству. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума ранее был (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом) или был диагностирован (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом) эозинофильный гастрит, и у индивидуума есть один или несколько симптомов эозинофильного гастрита (*например*, симптоматического) без повышенного содержания эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления, у

индивидуума ранее был или был диагностирован (*например*, в анамнезе) эозинофильный гастроэнтерит, но у него отсутствуют повышенные эозинофилы (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом). В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума был (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом) или ранее был диагностирован (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом) эозинофильный гастроэнтерит, и у индивидуума есть один или несколько симптомов эозинофильного гастроэнтерита (*например*, симптоматического) без повышенного содержания эозинофилов. Например, до лечения анти-Siglec-8 антителом у индивидуума может не быть повышенного уровня эозинофилов (*например*, из биопсии, как описано в настоящем документе), но, возможно, уже имелся анамнез или диагноз эозинофильного гастрита или эозинофильного гастроэнтерита. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума имеется или диагностирована функциональная диспепсия (*например*, до лечения анти-Siglec-8 антителом). Не желая быть связанными теорией, считается, что повышенные тучные клетки могут быть ответственны за симптоматику таких болезненных состояний, как GERD, IBS и функциональная диспепсия, *например*, наличие симптомов, имеющих сходство с эозинофильным гастритом/гастроэнтеритом, даже если количество эозинофилов в слизистой оболочке желудка и/или двенадцатиперстной кишки (*например*, из биопсии, как обсуждается в настоящем документе) не соответствует клиническим стандартам для эозинофильного заболевания/вовлечения.

В некоторых вариантах осуществления, индивидуум имеет повышенное количество тучных клеток (*например*, по сравнению с эталоном тучных клеток), по меньшей мере, в части слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки, но не имеет повышенное количество эозинофилов (*например*, по сравнению с эталоном эозинофилов), по меньшей мере, в части слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки (*например*, при тучноклеточном гастрите или тучноклеточном гастроэнтерите). В некоторых вариантах осуществления, индивидуум имеет повышенное количество тучных клеток (*например*, по сравнению с эталоном тучных клеток), по меньшей мере, в части слизистой оболочки пищевода, но не имеет повышенное количество эозинофилов (*например*, по сравнению с эталоном эозинофилов), по меньшей мере, в части слизистой оболочки пищевода (*например*, при тучноклеточном эзофагите).

В некоторых вариантах осуществления, образец, полученный из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки индивидуума, имеет повышенное количество тучных клеток, *например*, по сравнению с эталоном тучных клеток, но образец, полученный из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки индивидуума не имеет повышенное количество эозинофилов, *например*, по сравнению с эталоном эозинофилов (*например*, для тучноклеточного гастрита или тучноклеточного гастроэнтерита). В некоторых вариантах осуществления, образцы

являются одним образцом. В некоторых вариантах осуществления, образцы являются разными образцами. В некоторых вариантах осуществления, образцы взяты из ткани одного и того же типа. В некоторых вариантах осуществления, образец, полученный из слизистой оболочки пищевода индивидуума, имеет повышенное количество тучных клеток, *например*, по сравнению с эталоном тучных клеток, но образец, полученный из слизистой оболочки пищевода индивидуума, не имеет повышенного количества эозинофилов, *например*, по сравнению с эталоном эозинофилов (*например*, при тучноклеточном эзофагите). В некоторых вариантах осуществления, образцы являются одним образцом. В некоторых вариантах осуществления, образцы являются разными образцами.

В некоторых вариантах осуществления, образец слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки имеет, по меньшей мере, одно, по меньшей мере, два, по меньшей мере, три, по меньшей мере, четыре или, по меньшей мере, пять полей зрения (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 30 или более тучных клеток в HPF. В некоторых вариантах осуществления, образец слизистой оболочки пищевода имеет, по меньшей мере, одно, два, три, четыре или пять полей зрения (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 10 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления, образец слизистой оболочки пищевода имеет, по меньшей мере, одно, два, три, четыре или пять полей зрения (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 20 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления, образец слизистой оболочки пищевода имеет, по меньшей мере, одно, два, три, четыре или пять полей зрения (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 25 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления пиковое количество тучных клеток, полученное из двух или более HPF из образца из слизистой оболочки пищевода, составляет 10 или более тучных клеток в HPF. В некоторых вариантах осуществления, пиковое количество тучных клеток, полученное из двух или более HPF из образца слизистой оболочки пищевода, составляет 15 или более тучных клеток в HPF. В некоторых вариантах осуществления, индивидуум выбирается для лечения (*например*, с использованием любого из способов настоящего описания), если образец (*например*, образец биопсии), полученный от индивидуума, имеет, по меньшей мере, один, два, три, четыре или пять полей зрения (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 10 или более в HPF (для образца из слизистой оболочки пищевода). В некоторых вариантах осуществления, индивидуум выбирается для лечения (*например*, с использованием любого из способов настоящего описания), если образец (*например*, образец биопсии), полученный от индивидуума, имеет, по меньшей мере, один, два, три, четыре или пять полей зрения (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 30 или более в HPF (для образца слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки или подвздошной кишки). В некоторых вариантах осуществления, индивидуум выбирается для лечения (*например*, с использованием любого из способов настоящего описания), если образец (*например*,

образец биопсии), полученный от индивидуума, имеет, по меньшей мере, один, два, три, четыре или пять полей зрения (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 10 или более в HPF (для образца из слизистой оболочки пищевода). В некоторых вариантах осуществления, индивидуум выбирается для лечения (*например*, с использованием любого из способов настоящего описания), если образец (*например*, образец биопсии), полученный от индивидуума, имеет, по меньшей мере, один, два, три, четыре или пять полей зрения (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 20 или более в HPF (для образца слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки или подвздошной кишки). В некоторых вариантах осуществления, индивидуум выбирается для лечения (*например*, с использованием любого из способов настоящего описания), если образец (*например*, образец биопсии), полученный от человека, имеет, по меньшей мере, один, два, три, четыре или пять полей зрения (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 20-30 тучных клеток в HPF (для образца слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки или подвздошной кишки).

В некоторых вариантах осуществления, количество тучных клеток в образце определяется за менее примерно 14, менее примерно 28, менее примерно 35, менее примерно 45 или менее примерно 90 дней до введения композиции или анти-Siglec-8 антитела по настоящему раскрытию.

В некоторых вариантах осуществления, образец слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки или подвздошной кишки содержит одно или несколько HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов менее 30 эозинофилов в HPF. В некоторых вариантах осуществления, образец из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки или подвздошной кишки не содержит, по меньшей мере, одно, по меньшей мере два, по меньшей мере три, четыре или пять HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов 30 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления, образец слизистой оболочки желудка не содержит, по меньшей мере, пять HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов 30 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления, образец слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки, тощей кишки или подвздошной кишки не содержит, по меньшей мере, три HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов 30 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления, индивидуума выбирают для лечения (*например*, с использованием любого из способов настоящего изобретения), если образец (*например*, образец биопсии), полученный от индивидуума имеет, по меньшей мере, одно, по меньшей мере, два, по меньшей мере, три, по меньшей мере, четыре или, по меньшей мере, пять полей зрения (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 30 или более в HPF (для образца слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки или подвздошной кишки), и если образец (*например*, образец биопсии), полученный от индивидуума, не содержит повышенных эозинофилов, *например*, если образец слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки или

подвздошной кишки не содержит, по меньшей мере, одно, по меньшей мере, два, по меньшей мере, три, по меньшей мере, четыре, или, по меньшей мере, пять HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов 30 или более в HPF (*например*, если образец слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки или подвздошной кишки не содержит, по меньшей мере, одно, по меньшей мере, два, по меньшей мере, три, по меньшей мере, четыре или, по меньшей мере, пять HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов 30 или более эозинофилов в HPF, или если образец слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки или подвздошной кишки не содержит, по меньшей мере, пять HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов 30 или более в HPF). Например, образец эозинофилов может иметь 1, 2, 3, 4 или 5 HPF, или все протестированные HPF могут не соответствовать клиническим критериям эозинофильного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления, образец слизистой оболочки толстой кишки содержит одно или несколько HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов менее 60 эозинофилов в HPF. В некоторых вариантах осуществления, образец слизистой оболочки толстой кишки не содержит, по меньшей мере, одно, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере, четыре или, по меньшей мере, пять HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов 60 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления, образец слизистой оболочки толстой кишки не содержит, по меньшей мере, пять HPF, каждый из которых имеет количество эозинофилов 60 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления, образец слизистой оболочки толстой кишки не содержит, по меньшей мере, три HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов 60 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления, образец слизистой оболочки толстой кишки не содержит, по меньшей мере, два HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов 60 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления, образец из слизистой оболочки толстой кишки не имеет HPF, которое имеет количество эозинофилов в 60 или более эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления, индивидуума выбирают для лечения (*например*, с использованием любого из способов настоящего описания), если образец (*например*, образец биопсии), полученный от индивидуума, имеет, по меньшей мере, одно, два, три, четыре или пять полей зрения (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 20, 30 или более в HPF (для образца слизистой оболочки толстой кишки), и если образец (*например*, образец биопсии), полученный от индивидуума, не имеет повышенное содержание эозинофилов, *например*, если образец слизистой оболочки толстой кишки не содержит, по меньшей мере, одно, по меньшей мере, два, по меньшей мере, три, по меньшей мере, четыре или, по меньшей мере, пять HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов 60 или более в HPF (*например*, если образец слизистой оболочки толстой кишки не содержит, по меньшей мере, одно, два, три, четыре или пять HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов 60 или более эозинофилов в HPF). Например, образец эозинофилов может иметь 1, 2, 3, 4 или 5 HPF, или все

протестированные HPF могут не соответствовать клиническим критериям эозинофильного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления, образец из пищевода слизистой оболочки имеет одно или несколько HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов менее 10 эозинофилов в HPF. В некоторых вариантах осуществления, образец слизистой оболочки пищевода не содержит, по меньшей мере, одно, по меньшей мере, два, по меньшей мере, три, четыре или пять HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов 10 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления индивидуума выбирают для лечения (*например*, с использованием любого из способов настоящего изобретения), если образец (*например*, образец биопсии), полученный от индивидуума имеет, по меньшей мере, одно, по меньшей мере, два, по меньшей мере, три, по меньшей мере, четыре или, по меньшей мере, пять полей зрения (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 10 или более в HPF (для образца слизистой оболочки пищевода), и если образец (*например*, образец биопсии) полученный от индивидуума не имеет повышенных эозинофилов, *например*, если образец слизистой оболочки пищевода не имеет, по меньшей мере, одно, по меньшей мере, два, по меньшей мере, три, по меньшей мере, четыре или, по меньшей мере, пять HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов 10 или больше эозинофилов в HPF. Например, образец эозинофилов может иметь 1, 2, 3, 4 или 5 HPF, или все протестированные HPF могут не соответствовать клиническим критериям эозинофильного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления, образец слизистой оболочки пищевода содержит одно или несколько HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов менее 15 эозинофилов в HPF. В некоторых вариантах осуществления, образец слизистой оболочки пищевода не содержит, по меньшей мере, одно, по меньшей мере, два, по меньшей мере, три, четыре или пять HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов 15 или более в HPF. В некоторых вариантах осуществления индивидуума выбирают для лечения (*например*, с использованием любого из способов настоящего изобретения), если образец (*например*, образец биопсии), полученный от индивидуума имеет, по меньшей мере, одно, по меньшей мере, два, по меньшей мере, три, по меньшей мере, четыре или, по меньшей мере, пять полей зрения (HPF), каждое из которых имеет количество тучных клеток 15 или более в HPF (для образца слизистой оболочки пищевода), и если образец (*например*, образец биопсии) полученный от индивидуума, не имеет повышенных эозинофилов, *например*, если образец слизистой оболочки пищевода не содержит, по меньшей мере, одно, по меньшей мере, два, по меньшей мере, три, по меньшей мере, четыре или, по меньшей мере, пять HPF, каждое из которых имеет количество эозинофилов 15 или больше эозинофилов в HPF. Например, образец эозинофилов может иметь 1, 2, 3, 4 или 5 HPF, или все протестированные HPF могут не соответствовать клиническим критериям эозинофильного заболевания.

В некоторых вариантах осуществления несколько HPF (*например*, 2, 3, 4 или 5 HPF, как описано в настоящем документе) могут быть получены из одной биопсии (*см.*

Caldwell, J.M. et al. (2014) J. Allergy Clin. Immunol. 134:1114-1124) или, в некоторых случаях, из нескольких биопсий. HPF по настоящему описанию могут быть получены из 1, 2, 3, 4 или 5 образцов (*например*, индивидуальных биопсий). Другими словами, в качестве примера, 5 HPF могут быть из всего 2 образцов (*например*, 3 HPF из одного образца и 2 из другого, вместо того, чтобы требовать 5 HPF из каждого из двух образцов).

В некоторых вариантах осуществления, образец, используемый для подсчета тучных клеток и/или эозинофилов, получают при биопсии желудка или двенадцатиперстной кишки. В некоторых вариантах осуществления, образец, используемый для подсчета тучных клеток и/или эозинофилов, получают из биопсии пищевода. В некоторых вариантах осуществления, образец, используемый для подсчета тучных клеток и/или эозинофилов, получают при эзофагогатродуоденоскопии (EGD) с биопсией. В некоторых вариантах осуществления, несколько образцов могут быть получены из одной биопсии. Например, биопсия пищевода может содержать 4-6 образцов, представляющих различные части пищевода (*например*, 2 образца из проксимального отдела пищевода, 2 образца из среднего отдела пищевода и 2 образца из дистального отдела пищевода).

В некоторых вариантах осуществления, количество тучных клеток сравнивают с эталоном тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления, количество эозинофилов сравнивают с эталоном эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления, эталон тучных клеток или эозинофилов относится к образцу, полученному от индивидуума, у которого нет эзофагита, гастрита, колита или гастроэнтерита. В некоторых вариантах осуществления, эталон тучных клеток или эозинофилов относится к числовому пороговому значению, используемому для диагностики тучноклеточного или эозинофильного эзофагита, гастрита, колита или гастроэнтерита (*например*, количеству тучных клеток или эозинофилов, необязательно в HPF, используемому в качестве порогового значения в диагностике, как описано выше). В некоторых вариантах осуществления, эталон тучных клеток или эозинофилов относится к среднему количеству тучных клеток или эозинофилов, полученных из множества образцов. Как отмечено в настоящем документе, контрольное значение и/или исходное значение может быть получено от одного индивидуума, от двух разных индивидуумов или от группы индивидуумов (*например*, группы из двух, трех, четырех, пяти или более индивидуумов).

В некоторых вариантах осуществления, количество тучных клеток в образце определяют по окрашиванию гематоксилином и эозином (H&E). В некоторых вариантах осуществления, количество тучных клеток в образце определяют иммуногистохимическим (ИНС) окрашиванием на маркер тучных клеток, включая, без ограничения, триптазу, CD117 (c-kit) или рецептор IgE. В некоторых вариантах осуществления, активация тучных клеток определяется (*например*, определяются активированные тучные клетки) путем ИНС окрашивания на триптазу и количественного определения дегрануляции тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления, активация тучных клеток определяется (*например*, определяются активированные тучные

клетки) путем окрашивания на маркеры активации тучных клеток (включая, без ограничений, CD63 и/или CD107a), *например*, проточной цитометрией или ИНС.

Хотя определение тучных клеток и эозинофилов описано выше с использованием ИНС и образцов ткани, тучноклеточную нагрузку и/или активацию также можно анализировать через измерение биомаркеров в сыворотке, крови или моче. В некоторых вариантах осуществления, индивидуума, который был протестирован на аномально высокие уровни в одном или нескольких из этих анализов и, необязательно, не был протестирован на высокие уровни эозинофилов, можно лечить с использованием способов настоящего описания. В некоторых вариантах осуществления, количество и/или активность тучных клеток у индивидуума оценивают через сывороточную триптазу или бета-триптазу. В некоторых вариантах осуществления, количество и/или активность тучных клеток у индивидуума оценивают по уровню в крови триптазы, гистамина, лейкотриена e<sub>4</sub>, простагландина D<sub>2</sub> и/или гепарина. В некоторых вариантах осуществления, количество и/или активность тучных клеток у индивидуума оценивают по уровню в моче N-метилгистамина, простагландина F<sub>2</sub> альфа и/или простагландина D<sub>2</sub>.

#### *В. Ответ на лечение*

В некоторых вариантах осуществления, введение индивидууму, как описано в настоящем документе (*например*, индивидууму, имеющему тучноклеточный гастрит, тучноклеточный эзофагит, тучноклеточный колит, тучноклеточный энтерит, тучноклеточный дуоденит и/или тучноклеточный гастроэнтерит) эффективного количества композиции по настоящему описанию или антитела, описанного в настоящем документе, которое связывается с Siglec-8 человека (*например*, анти-Siglec-8 антитела), снижает один или несколько (*например*, один или несколько, два или несколько, три или несколько, четыре или несколько и *т. д.*) у индивидуума, по сравнению с исходным уровнем до введения антитела.

Ответ на лечение у лиц с тучноклеточным гастритом, тучноклеточным эзофагитом, тучноклеточным колитом, тучноклеточным энтеритом, тучноклеточным дуоденитом и/или тучноклеточным гастроэнтеритом может быть оценен с помощью различных способов. Например, количество, активность и/или расположение тучных клеток в образце могут быть изменены после лечения. В некоторых вариантах осуществления, количество тучных клеток в образце, полученном от индивидуума после лечения, уменьшается по сравнению с количеством тучных клеток в образце, полученном до лечения. В некоторых вариантах осуществления, активность тучных клеток у индивидуума или в образце, полученном от индивидуума после лечения, снижена по сравнению с активностью тучных клеток у индивидуума или в образце, полученном до лечения. В некоторых вариантах осуществления одно или оба из количества или активности тучных клеток в образце, полученном из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки индивидуума, уменьшаются после введения композиции по настоящему описанию по сравнению с исходным уровнем перед введением композиции. В некоторых вариантах

осуществления, одно или несколько из количества, активности или местоположения тучных клеток в образце, полученном из слизистой оболочки пищевода индивидуума, уменьшаются после введения композиции по настоящему описанию по сравнению с исходным уровнем до введения композиции.

В некоторых вариантах осуществления, ответ на лечение композицией или анти-Siglec-8 антителом по настоящему описанию оценивают по уровню экспрессии одного или нескольких генов или полипептидов в образце (*например*, образце сыворотки), полученном от индивидуума. Например, в некоторых вариантах осуществления, сывороточная триптаза; бета-триптаза; уровни триптазы, гистамина, лейкотриена e4, простагландина D2 и/или гепарина в крови; и/или уровни N-метилгистамина, простагландина F2 альфа и/или простагландина D2 в моче у индивидуума снижаются, *например*, по сравнению с исходным уровнем, полученным от индивидуума до введения композиции или антитела, или по сравнению с подходящим эталонным значением.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько симптомов у индивидуума уменьшаются после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции. Симптомы гастрита и гастроэнтерита включают, без ограничений, боль в животе, тошноту, рвоту, потерю аппетита, спазмы в животе, чувство насыщения до окончания еды, вздутие живота, диарею и жидкий или водянистый стул. Симптомы эзофагита включают, без ограничений, изжогу, тошноту, дисфагию/затрудненное глотание, рвоту, боль в животе, кашель, затруднение приема пищи, раннее насыщение, потерю аппетита, боль в груди, непереносимость или отказ от еды и гастроэзофагеальный рефлюкс. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько симптомов отслеживаю с использованием опросника результатов лечения по оценке пациента (PRO), который можно заполнять, *например*, ежедневно. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько симптомов отслеживаю путем добавления или усреднения баллов из ежедневного опросника результатов лечения по оценке пациента (PRO), полученного в течение определенного периода времени, *например*, одной недели, двух недель, трех недель, четырех недель/1 месяца и т.д. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько симптомов у индивидуума уменьшаются на, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 55%, по меньшей мере, 60%, или по меньшей мере 65% после введения композиции по сравнению с исходным уровнем перед введением композиции, *например*, по данным баллов опросника PRO. Например, в некоторых вариантах осуществления, один или несколько симптомов у индивидуума уменьшаются на, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 55%, по меньшей мере, 60%, или по меньшей мере 65% после введения композиции по сравнению с исходным уровнем перед введением композиции, *например*, по данным средних или медианных баллов по опроснику PRO за одну неделю, две недели, три недели или четыре недели/1 месяц.

В некоторых вариантах осуществления, введение композиции или анти-Siglec-8 антитела по настоящему описанию дает устойчивый ответ на лечение. В некоторых вариантах осуществления, введение композиции или антитела по настоящему описанию

дает полный ответ на лечение (например, после прекращения лечения или после однократной дозы антитела или композиции).

Термины «исходный уровень» или «исходное значение», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, могут относиться к измерению или характеристике симптома перед введением терапии (*например*, анти-Siglec-8 антитела) или в начале введения терапии. Исходное значение можно сравнить с эталонным значением, чтобы определить уменьшение или улучшение симптомов тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного колита, тучноклеточного энтерита, тучноклеточного дуоденита и/или тучноклеточного гастроэнтерита, рассматриваемых в настоящем документе. Контрольное значение и/или исходное значение может быть получено от одного индивидуума, от двух разных индивидуумов или от группы индивидуумов (*например*, группы из двух, трех, четырех, пяти или более индивидуумов).

Термины «эталон» или «эталонное значение» используются в настоящем описании взаимозаменяемо и могут относиться к измерению или характеристике значения или симптомов у индивидуума без тучноклеточного гастрита или тучноклеточного гастроэнтерита (или в группе таких индивидуумов). «Эталонное значение» может быть абсолютным значением; относительным значением; значением, имеющим верхний и/или нижний предел; диапазоном значений; средним значением; медианным значением; средним значением; или значением по сравнению с исходным значением. Точно так же «исходное значение» может быть абсолютным значением; относительным значением; значением, имеющим верхний и/или нижний предел; диапазоном значений; средним значением; медианным значением; средним значением; или значением по сравнению с эталонным значением. Эталонное значение может быть получено от одного индивидуума, от двух разных индивидуумов или от группы индивидуумов (*например*, группы из двух, трех, четырех, пяти или более индивидуумов). В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение относится к стандартному или контрольному значению в области техники. В некоторых вариантах осуществления, эталонное значение относится к значению, рассчитанному *de novo* от одного или нескольких индивидуумов (*например*, без тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного колита или тучноклеточного гастроэнтерита).

### *С. Введение*

В некоторых вариантах осуществления, до введения композиции или анти-Siglec-8 антитела по настоящему описанию, у индивидуума не было успешным или не получился адекватный контроль состояния одним или несколькими стандартными способами лечения эзофагита, гастрита и/или гастроэнтерита. Типовые стандартные способы лечения эзофагита, гастрита или гастроэнтерита включают, без ограничения, лечение ингибитором протонной помпы (PPI), лечение кортикостероидами и диетическое лечение.

Для профилактики или лечения заболевания подходящая доза активного агента будет зависеть от типа заболевания, которое подлежит лечению, как определено выше, тяжести и течения заболевания, от того, вводится ли агент для профилактики или в

терапевтических целях, предыдущей терапии, истории болезни индивидуума и ответа на агент, а также на усмотрение лечащего врача. Агент подходящим образом вводят индивидууму за один раз или в течение серии курсов лечения. В некоторых вариантах осуществления, интервал между введениями анти-Siglec-8 антитела (*например*, антитела, которое связывается с Siglec-8 человека), описанного в настоящем документе, составляет примерно один месяц или дольше. В некоторых вариантах осуществления, интервал между введениями составляет примерно 1 месяц, примерно два месяца, примерно три месяца, примерно четыре месяца, примерно пять месяцев, примерно шесть месяцев или дольше. В настоящем документе, интервал между введениями относится к периоду времени между одним введением антитела и следующим введением антитела. В настоящем документе, интервал примерно в один месяц включает четыре недели. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, интервал между введениями составляет примерно четыре недели, примерно пять недель, примерно шесть недель, примерно семь недель, примерно восемь недель, примерно девять недель, примерно десять недель, примерно одиннадцать недель, примерно двенадцать недель, примерно шестнадцать недель, примерно двадцать недель, примерно двадцать четыре недели или дольше. В некоторых вариантах осуществления, лечение включает многократные введения антитела, при этом интервал между введениями может варьироваться. Например, интервал между первым введением и вторым введением составляет примерно один месяц, а интервалы между последующими введениями составляют примерно три месяца. В некоторых вариантах осуществления, интервал между первым введением и вторым введением составляет примерно один месяц, интервал между вторым введением и третьим введением составляет примерно два месяца, а интервалы между последующими введениями составляют примерно три месяца. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе (*например*, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), вводят в базовой дозе. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе (*например*, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), вводят индивидууму в дозировке от примерно 0,1 мг до примерно 1800 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело (*например*, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека) вводят индивидууму при дозировке примерно 0,1 мг, 0,5 мг, 1 мг, 5 мг, 10 мг, 20 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 60 мг, 70 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1100 мг, 1200 мг, 1300 мг, 1400 мг, 1500 мг, 1600 мг, 1700 мг и 1800 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе (*например*, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), вводят индивидууму в дозировке от примерно 150 мг до примерно 450 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления анти-Siglec-8 антитело (*например*, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека) вводят индивидууму в любой дозе из 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг и 450 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления, анти-

Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе (*например*, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), вводят индивидууму в дозировке от примерно 0,1 мг/кг до примерно 20 мг/кг на дозу. В некоторых вариантах осуществления, описанное в настоящем документе анти-Siglec-8 антитело (*например*, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека) вводят индивидууму в дозировке от примерно 0,01 мг/кг до примерно 10 мг/кг на дозу. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе (*например*, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), вводят индивидууму в дозировке от примерно 0,1 мг/кг до примерно 10 мг/кг, примерно 1,0 от мг/кг до примерно 10 мг/кг или от примерно 0,3 мг/кг до примерно 1,0 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе, вводят индивидууму в дозировке примерно 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,9 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,5 мг/кг, 4,0 мг/кг, 4,5 мг/кг, 5,0 мг/кг, 5,5 мг/кг, 6,0 мг/кг, 6,5 мг/кг, 7,0 мг/кг, 7,5 мг/кг, 8,0 мг/кг, 8,5 мг/кг, 9,0 мг/кг, 9,5 мг/кг или 10,0 мг/кг. Может использоваться любая частота дозирования, описанная выше. Любая частота дозирования, описанная выше, может использоваться в способах или применениях композиций, описанных в настоящем документе. Эффективность лечения антителом, описанным в настоящем документе (*например*, антителом, которое связывается с Siglec-8 человека), можно оценить с использованием любой из методологий или анализов, описанных в настоящем документе, с интервалами в диапазоне от одного раза в неделю до одного раза в три месяца. В некоторых вариантах осуществления, эффективность лечения (*например*, снижение или повышение одного или нескольких симптомов) оценивают примерно каждый месяц, примерно каждые два месяца, примерно каждые три месяца, примерно каждые четыре месяца, примерно каждые пять месяцев, примерно каждые шесть месяцев или дольше после введения антитела, которое связывается с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления, эффективность лечения (*например*, снижение или повышение одного или нескольких симптомов) оценивают примерно каждую неделю, примерно каждые две недели, каждые три недели, примерно каждые четыре недели, примерно каждые пять недель, примерно каждые шесть недель, примерно каждые семь недель, примерно каждые восемь недель, примерно каждые девять недель, примерно каждые десять недель, примерно каждые одиннадцать недель, примерно каждые двенадцать недель, примерно каждые шестнадцать недель, примерно каждые двадцать недель, примерно каждые двадцать четыре недели или дольше.

В некоторых вариантах осуществления анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе (*например*, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), вводят индивидууму (*например*, внутривенной инфузией) в одной или нескольких дозах, составляющих примерно от 0,1 мг/кг до 4,0 мг/кг на антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело вводят индивидууму внутривенной инфузией в одной или нескольких дозах, содержащих от примерно 0,3 мг/кг и 3,0 мг/кг антитела, *например*, примерно 0,3 мг/кг антитела, примерно 0,5 мг/кг антитела, примерно 1,0 мг/кг

антитела, примерно 1,5 мг/кг антитела, примерно 2,0 мг/кг антитела, примерно 2,5 мг/кг антитела или примерно 3,0 мг/кг антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело вводят индивидууму (*например*, внутривенной инфузией) в двух или нескольких дозах (*например*, содержащих от примерно 0,3 мг/кг до 3,0 мг/кг антитела) с интервалом примерно 28 дней. В некоторых вариантах осуществления, антитело вводят индивидууму (*например*, внутривенной инфузией) ежемесячно в двух или нескольких дозах (*например*, содержащих от примерно 0,3 мг/кг до 3,0 мг/кг антитела). В некоторых вариантах осуществления, антитело вводят индивидууму (*например*, внутривенной инфузией) в двух или нескольких дозах (*например*, содержащих от примерно 0,3 мг/кг и 3,0 мг/кг антитела) с интервалом примерно 4 недель. В некоторых вариантах осуществления, антитело вводят индивидууму (*например*, внутривенной инфузией) согласно следующему графику: день 1, день 29, день 57, день 85, день 113 и день 141. В некоторых вариантах осуществления, антитело вводят индивидууму внутривенной инфузией в первой дозе, содержащей примерно 0,3 мг/кг антитела, второй дозе, содержащей примерно 1,0 мг/кг антитела, третьей дозе, содержащей примерно 1,0 мг/кг антитела, четвертой дозе, содержащей от примерно 1,0 мг/кг до примерно 3,0 мг/кг антитела, пятой дозе, содержащей от примерно 1,0 мг/кг до примерно 3,0 мг/кг антитела, и шестой дозе, содержащей от примерно 1,0 мг/кг до примерно 3,0 мг/кг антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело вводят индивидууму внутривенной инфузией в первой дозе, содержащей примерно 0,3 мг/кг антитела, второй дозе, содержащей примерно 1,0 мг/кг антитела, третьей дозе, содержащей примерно 1,0 мг/кг антитела, четвертой дозе, содержащей примерно 1,0 мг/кг или примерно 3,0 мг/кг антитела, пятой дозе, содержащей примерно 1,0 мг/кг или примерно 3,0 мг/кг антитела, и шестой дозе, содержащей примерно 1,0 мг/кг антитела или примерно 3,0 мг/кг антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело вводят индивидууму внутривенной инфузией в первой дозе, содержащей примерно 0,3 мг/кг антитела, второй дозе, содержащей примерно 1,0 мг/кг антитела, третьей дозе, содержащей примерно 1,0 мг/кг антитела, четвертой дозе, содержащей примерно 1,0 мг/кг антитела, пятой дозе, содержащей примерно 1,0 мг/кг антитела, и шестой дозе, содержащей примерно 1,0 мг/кг антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой: примерно 0,3 мг/кг антитела в день 1, примерно 1,0 мг/кг антитела в день 29, примерно 1,0 мг/кг антитела в день 57, примерно 1,0 мг/кг или примерно 3,0 мг/кг антитела в день 85, примерно 1,0 мг/кг или примерно 3,0 мг/кг антитела в день 113 и примерно 1,0 мг/кг или примерно 3,0 мг/кг антитела в день 141.

Антитела, описанные в настоящем документе, которые связываются с Siglec-8 человека могут быть использованы либо отдельно, либо в комбинации с другими агентами в способах, описанных в настоящем документе. Например, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека может быть совместно введено с одним или несколькими (*например*, одним или более, двумя или более, тремя или более, четырьмя или более, и *т.д.*) дополнительными терапевтическими агентами для лечения и/или профилактики гастрита,

эзофагита и/или гастроэнтерита. Дополнительные терапевтические агенты для лечения и/или профилактики гастрита, эзофагита и/или гастроэнтерита включают, без ограничения, PPI, системные кортикостероиды, местные кортикостероиды, антигистаминные препараты, стабилизаторы тучных клеток, H-2 блокаторы, анти-IgE антитела, ингибиторы кальциневрина, иммуномодуляторы и иммунодепрессанты (*например*, азатиоприн, 6-MP, MMF и ингибиторы mTOR).

Такие комбинированные терапии, указанные выше, включают комбинированное введение (когда два или более терапевтических агента включены в один и тот же или отдельные составы) и раздельное введение, и в этом случае введение антитела по настоящему описанию может происходить до, одновременно и/или после введения одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления, введение анти-Siglec-8 антитела, описанного в настоящем документе, и введение одного или более дополнительных терапевтических агентов с происходит с интервалом примерно один месяц, примерно два месяца, примерно три месяца, примерно четыре месяца, примерно пять месяцев или примерно шесть месяцев. В некоторых вариантах осуществления, введение анти-Siglec-8 антитела, описанного в настоящем документе, и введение одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов происходит с интервалом примерно одна неделя, примерно две недели или примерно три недели. В некоторых вариантах осуществления, введение анти-Siglec-8 антитела, описанного в настоящем документе, и введение одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов происходит с интервалом примерно один день, примерно два дня, примерно три дня, примерно четыре дня, примерно пять дней, или примерно шесть дней.

Анти-Siglec8 антитела и/или один или несколько дополнительных терапевтических агентов могут быть введены любым подходящим способом введения, известным в данной области техники, включая, без ограничения, пероральное введение, сублингвальное введение, буккальное введение, местное введение, ректальное введение, ингаляцию, трансдермальное введение, подкожную инъекцию, внутрикожную инъекцию, внутривенную (ВВ) инъекцию, внутриартериальную инъекцию, внутримышечную инъекцию, внутрисердечную инъекцию, внутрикостную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию, трансмукозальное введение, вагинальное введение, интравитреальное введение, внутрисуставное введение, перисуставное введение, местное введение, подкожное введение или любые их комбинации.

#### *D. Антитела*

Некоторые аспекты настоящего описания представляют выделенные антитела, которые связываются с Siglec-8 человека (*например*, агонистическим антителом, которое связывается с Siglec-8 человека). В некоторых вариантах осуществления, описанное в настоящем документе анти-Siglec-8 антитело имеет одну или несколько из следующих характеристик: (1) связывается с Siglec-8 человека; (2) связывается с внеклеточным доменом Siglec-8 человека; (3) связывается с Siglec-8 человека с более высокой

аффинностью, чем антитело 2E2 мыши и/или антитело 2C4 мыши; (4) связывается с Siglec-8 человека с большей авидностью, чем антитело 2E2 мыши и/или антитело 2C4 мыши; (5) имеет  $T_m$  примерно 70-72°C или выше в анализе теплового сдвига; (6) имеет пониженную степень фукозилирования или является не фукозилированным; (7) связывается с Siglec-8 человека, экспрессируемым на эозинофилах, и вызывает апоптоз эозинофилов; (8) связывается с Siglec-8 человека, экспрессируемым на тучных клетках, и истощает или уменьшает количество тучных клеток; (9) связывается с Siglec-8 человека, экспрессируемым на тучных клетках, и ингибирует FcεRI-зависимую активность тучных клеток (*например*, высвобождение гистамина, высвобождение PGD<sub>2</sub>, поток Ca<sup>2+</sup> и/или высвобождение β-гексозаминидазы и т. д.); (10) разработано для улучшения активности ADCC; (11) связывается с Siglec-8 человека, экспрессируемым на тучных клетках, и убивает тучные клетки за счет активности ADCC (*in vitro* и/или *in vivo*); (12) связывается с Siglec-8 человека и приматов, не являющихся человеком; (13) связывается с доменом 1, доменом 2 и/или доменом 3 Siglec-8 человека или связывается с полипептидом Siglec-8, содержащим домен 1, домен 2 и/или домен 3 Siglec-8 человека (*например*, слитыми белками, описанными в настоящем документе); и (14) истощает активированные эозинофилы с EC<sub>50</sub> меньше, чем EC<sub>50</sub> от антитела 2E2 или 2C4 мыши. Любое из антител, описанных в патенте США № US 9,546,215 и/или WO 2015089117 могут найти применение в способах, композициях и наборах, представленных в настоящем документе.

В одном аспекте, настоящее описание представляет антитела, которые связываются с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления, Siglec-8 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления, Siglec-8 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, связывается с Siglec-8 человека, экспрессируемым на тучных клетках, и истощает или уменьшает количество тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, связывается с Siglec-8 человека, экспрессируемым на тучных клетках, и ингибирует активность, опосредованную тучными клетками.

В одном аспекте, изобретение относится к антителам, которые связываются с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления, Siglec-8 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления, Siglec-8 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, связывается с эпитопом в домене 1 Siglec-8 человека, где домен 1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, связывается с эпитопом в домене 2 Siglec-8 человека, где домен 2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, связывается с эпитопом в домене 3 Siglec-8 человека, где домен 3

содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, связывается со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 116, но не со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления, описанное в настоящем документе антитело связывается со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 117, но не со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления, описанное в настоящем документе антитело связывается со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 117, но не со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 116. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, связывается с линейным эпитопом во внеклеточном домене Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, связывается с конформационным эпитопом во внеклеточном домене Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления, описанное в настоящем документе антитело связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на эозинофилах, и индуцирует апоптоз эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления, описанное в настоящем документе антитело связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на тучных клетках, и истощает тучные клетки. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на тучных клетках, и ингибирует активность, опосредованную тучными клетками. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на тучных клетках, и убивает тучные клетки за счет активности ADCC. В некоторых вариантах осуществления, описанное в настоящем документе антитело истощает тучные клетки и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления, указанное в настоящем документе антитело истощает активированные эозинофилы и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления, указанное в настоящем документе антитело (*например*, не фукозилированное анти-Siglec-8 антитело) истощает эозинофилы крови и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления, указанное в настоящем документе антитело (*например*, не фукозилированное анти-Siglec-8 антитело) истощает эозинофилы в периферической крови и ингибирует активацию тучных клеток.

В настоящем документе представлено изолированное анти-Siglec-8 антитело, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 приматов, не являющихся человеком. Идентификация антител с перекрестной реактивностью с приматами может быть полезна для доклинических испытаний анти-Siglec-8 антител у приматов, не являющихся человеком. В одном аспекте, изобретение относится к антителам, которые связываются с Siglec-8 приматов, не являющихся человеком. В одном аспекте, изобретение относится к антителам, которые связываются с Siglec-8 человека и Siglec-8 приматов, не являющихся человеком. В некоторых вариантах осуществления, Siglec-8 приматов, не являющихся человеком, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118 или ее часть.

В некоторых вариантах осуществления, Siglec-8 приматов, не являющихся человеком, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119 или ее часть. В некоторых вариантах осуществления приматом, не являющимся человеком, является павиан (*например*, *Papio Anubis*). В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 приматов, не являющихся человеком, связывается с эпитопом в домене 1 Siglec-8 человека. В дополнительном варианте осуществления, домен 1 Siglec-8 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 приматов, не являющихся человеком, связывается с эпитопом в домене 3 Siglec-8 человека. В другом варианте осуществления, домен 3 Siglec-8 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления, антителом, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8, не являющимся человеком, является гуманизированное антитело, химерное антитело или антитело человека. В некоторых вариантах осуществления, антителом, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 приматов, не являющихся человеком, является антитело мыши. В некоторых вариантах осуществления, антителом, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 приматов, не являющихся человеком, является антитело IgG1 человека.

В одном аспекте, описанное в настоящем документе анти-Siglec-8 антитело представляет собой моноклональное антитело. В одном аспекте, описанное в настоящем документе анти-Siglec-8 антитело представляет собой фрагмент антитела (включая антигенсвязывающий фрагмент), *например*, фрагмент Fab, Fab'-SH, Fv, scFv или (Fab')<sub>2</sub>. В одном из аспектов, описанное в настоящем документе анти-Siglec-8 антитело содержит фрагмент антитела (включая антигенсвязывающий фрагмент), *например* Fab, Fab'-SH, Fv, scFv или (Fab')<sub>2</sub> фрагмент. В одном аспекте, описанное в настоящем документе анти-Siglec-8 антитело представляет собой химерное, гуманизированное или человеческое антитело. В одном аспекте, любое из описанных в настоящем документе анти-Siglec-8 антител является очищенным.

В одном аспекте, представлены анти-Siglec-8 антитела, которые конкурируют с антителом 2E2 мыши и антителом 2C4 мыши за связывание с Siglec-8. Также представлены анти-Siglec-8 антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитело 2E2 мыши и антитело 2C4 мыши. Антитела мыши к Siglec-8, 2E2 и 2C4 антителу описаны в патенте США № 8,207,305; патенте США № 8,197,811, патенте США № 7,871,612 и патенте США № 7,557,191.

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

В одном аспекте настоящего описания представлены полинуклеотиды, кодирующие анти-Siglec-8 антитела. В некоторых вариантах осуществления, представлены векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие анти-Siglec-8 антитела. В некоторых вариантах осуществления, представлены клетки-хозяева, содержащие такие векторы. В другом аспекте настоящего описания представлены композиции, содержащие анти-Siglec-8 антитела или полинуклеотиды, кодирующие анти-Siglec-8 антитела. В некоторых вариантах осуществления, композицией по настоящему изобретению является фармацевтический состав для лечения тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного колита, тучноклеточного энтерита, тучноклеточного дуоденита и/или тучноклеточного гастроэнтерита. В некоторых вариантах осуществления, композицией по настоящему изобретению является фармацевтический состав для профилактики тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного колита, тучноклеточного энтерита, тучноклеточного дуоденита и/или тучноклеточного гастроэнтерита.

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

В одном аспекте, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее 1, 2, 3, 4, 5 или 6 HVR последовательностей антитела 1C3 мыши. В одном аспекте, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее 1, 2, 3, 4, 5 или 6 HVR последовательностей антитела 4F11 мыши. В одном аспекте, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее 1, 2, 3, 4, 5 или 6 HVR последовательностей антитела 1H10 мыши. В некоторых вариантах осуществления, HVR представляет собой Kabat CDR или Chothia CDR.

В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, связывается с эпитопом в домене 1 Siglec-8 человека, где домен 1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления, описанное в настоящем документе антитело связывается с эпитопом в домене 2 Siglec-8 человека, где домен 2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления, описанное в настоящем документе антитело связывается с эпитопом в домене 3 Siglec-8 человека, где домен 3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114.

В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем документе, связывается со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 116, но не со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления, описанное в настоящем документе антитело связывается со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 117, но не со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления,

описанное в настоящем документе антитело связывается со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 117, но не со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 116.

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

В другом аспекте в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; и/или вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и (iii) HVR -L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, связывается с эпитопом в домене 3 из Siglec-8 человека, где домен 3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 приматов, не являющихся человеком.

В другом аспекте, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96; и/или вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и (iii) HVR -L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, связывается с эпитопом в домене 1 Siglec-8 человека, где домен 1 содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 приматов, не являющихся человеком.

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

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

В одном аспекте, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и/или где переменная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71.

В другом аспекте, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 67-70; и/или где переменная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 71.

В другом аспекте, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; и/или вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103.

В другом аспекте, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; и/или вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104.

В другом аспекте, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96; и/или вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105.

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

соответственно).

В одном варианте осуществления, анти-Siglec-8 антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий каркасную последовательность и гиперпеременные области, где каркасная последовательность содержит последовательности HC-FR1-HC-FR4 SEQ ID NO: 26-29 (HC-FR1), SEQ ID NO: 31-36 (HC-FR2), SEQ ID NO: 38-43 (HC-FR3) и SEQ ID NO: 45 или 46 (HC-FR4) соответственно; HVR-H1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; HVR-H2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; и HVR-H3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63. В одном варианте осуществления, анти-Siglec-8 антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий каркасную последовательность и гиперпеременные области, где каркасная последовательность содержит последовательности HC-FR1-HC-FR4 SEQ ID NO: 26-29 (HC-FR1), SEQ ID NO: 31-36 (HC-FR2), SEQ ID NO: 38-43 (HC-FR3) и SEQ ID NO: 45 или 46 (HC-FR4) соответственно; HVR-H1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; HVR-H2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; и HVR-H3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 67-70. В одном варианте осуществления, анти-Siglec-8 антитело содержит переменный домен легкой цепи, содержащий каркасную последовательность и гиперпеременные области, где каркасная последовательность содержит последовательности LC-FR1-LC-FR4 SEQ ID NO: 48 или 49 (LC-FR1), SEQ ID NO: 51-53 (LC-FR2), SEQ ID NO: 55-58 (LC-FR3) и SEQ ID NO: 60 (LC-FR4) соответственно; HVR-L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; HVR-L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65; и HVR-L3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66. В одном варианте осуществления, анти-Siglec-8 антитело содержит переменный домен легкой цепи, содержащий каркасную последовательность и гиперпеременные области, где каркасная последовательность содержит последовательности LC-FR1-LC-FR4 SEQ ID NO: 48 или 49 (LC-FR1), SEQ ID NO: 51-53 (LC-FR2), SEQ ID NO: 55-58 (LC-FR3) и SEQ ID NO: 60 (LC-FR4) соответственно; HVR-L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; HVR-L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65; и HVR-L3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71. В одном варианте осуществления этих антител, переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2-10, а переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16-22. В одном варианте осуществления этих антител, переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2-10, а переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23 или 24. В одном варианте осуществления этих антител, переменный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11-14, а переменный домен легкой цепи содержит

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

В некоторых вариантах осуществления HVR последовательности тяжелой цепи содержат следующие:

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

В некоторых вариантах осуществления HVR последовательности тяжелой цепи содержат следующие:

- a) HVR-H1 (SYAMS (SEQ ID NO: 88); DYYMY (SEQ ID NO: 89); или SSWMN (SEQ ID NO: 90));
- b) HVR-H2 (IISGGSYTYYSDSVKG (SEQ ID NO: 91); RIAPEDGDTEYAPKFQG (SEQ ID NO: 92); или QIYPGDDYTNYNGKFKG (SEQ ID NO: 93)); и
- c) HVR-H3 (HETAQAAWFAY (SEQ ID NO: 94); EGNYYGSSILDY (SEQ ID NO: 95); или LGPYGPFAD (SEQ ID NO: 96)).

В некоторых вариантах осуществления FR последовательности тяжелой цепи включают следующие:

- a) HC-FR1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT (SEQ ID NO:26); EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLT (SEQ ID NO:27); QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS (SEQ ID NO:28); или QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLT (SEQ ID NO:29));
- b) HC-FR2 (WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO:31); WVRQAPGKGLEWLG (SEQ ID NO:32); WVRQAPGKGLEWLS (SEQ ID NO: 33); WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO:34); WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO:35); или WVRQPPGKGLEWLG (SEQ ID NO:36));
- c) HC-FR3 (RFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:38); RLSISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:39); RLTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:40); RFSISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:41); RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO:42); или

RLSISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO:43)); и

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

В некоторых вариантах осуществления HVR последовательности легкой цепи содержат следующие:

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

b) HVR-L2 (STSNLAS (SEQ ID NO: 65)); и

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

В некоторых вариантах осуществления HVR последовательности легкой цепи содержат следующие:

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и (iii) HVR -L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103;

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

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

В некоторых вариантах осуществления FR последовательности легкой цепи включают следующие:

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

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

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

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

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

(a) переменный домен тяжелой цепи, содержащий:

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

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

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

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

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

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

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

и/или

(b) переменный домен легкой цепи, содержащий:

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

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

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

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

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

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

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

В одном аспекте, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 2-10, и/или содержащее переменный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 16-22. В одном

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

В одном аспекте в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 106-108, и/или содержащее переменный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 109-111. В другом аспекте, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 106 и/или содержащее переменный домен легкой цепи SEQ ID NO: 109. В другом аспекте, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 107 и/или содержащее переменный домен легкой цепи SEQ ID NO: 110. В другом аспекте, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 108 и/или содержащее переменный домен легкой цепи SEQ ID NO: 111.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2-14. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 106-108. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности, содержит замены, вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело, содержащее эту аминокислотную последовательность, сохраняет способность связываться с Siglec-8

человека. В некоторых вариантах осуществления, замены, вставки или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) происходят в областях за пределами HVR (т.е. в FR). В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления анти-Siglec-8 антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 106-108.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 16-24. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 109-111. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности, содержит замены, вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело, содержащее эту аминокислотную последовательность, сохраняет способность связываться с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления, замены, вставки или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) происходят в областях за пределами HVR (т.е. в FR). В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело содержит переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 21. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 109-111.

В одном аспекте, настоящее описание представляет анти-Siglec-8 антитело, содержащее (a) одну, две или три VH HVR, выбранные из тех, которые показаны в таблице 1, и/или (b) одну, две или три VL HVR, выбранные из тех, которые показаны в таблице 1.

В одном аспекте, настоящее описание представляет анти-Siglec-8 антитело, содержащее (a) одну, две или три VH HVR, выбранные из тех, которые показаны в таблице 2, и/или (b) одну, две или три VL HVR, выбранные из тех, которые показаны в таблице 2.

В одном аспекте, настоящее описание представляет анти-Siglec-8 антитело, содержащее (a) одну, две, три или четыре VH FR, выбранные из тех, которые представлены в таблице 3, и/или (b) одну, две, три или четыре VL FR, выбранные из тех, которые представлены в таблице 3.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи и/или вариабельный домен легкой цепи антитела, показанного в таблице 4, например, НАКА антитело, НАКВ антитело, НАКС антитело, и т. д.

**Таблица 1.** Аминокислотные последовательности HVR антител

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

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

МЫШИ

Антител о	Цепь	HVR1	HVR2	HVR3
<b>1C3</b>	Тяжелая цепь	SYAMS SEQ ID NO:88	IISGGGSYTYYSDSVKG SEQ ID NO:91	HETAQAAWFA Y SEQ ID NO:94
<b>1H10</b>	Тяжелая цепь	DYYMY SEQ ID NO:89	RIAPEDGDTEYAPKFQG SEQ ID NO:92	EGNYYGSSILD Y SEQ ID NO:95
<b>4F11</b>	Тяжелая цепь	SSWMN SEQ ID NO:90	QIYPGDDYTNYNGKFK G SEQ ID NO:93	LGPYGPFFAD SEQ ID NO:96
<b>1C3</b>	Легкая цепь	SASSSVSYMН SEQ ID NO:97	DTSKLAY SEQ ID NO:100	QQWSSNPPT SEQ ID NO:103
<b>1H10</b>	Легкая цепь	RASQDITNYL N SEQ ID NO:98	FTSRLHS SEQ ID NO:101	QQGNTLPWT SEQ ID NO:104
<b>4F11</b>	Легкая цепь	SASSSVSYMY SEQ ID NO:99	DTSSLAS SEQ ID NO:102	QQWNSDPYT SEQ ID NO:105

**Таблица 3.** Аминокислотные последовательности FR антител

Тяжелая цепь	FR1	FR2	FR3	FR4
<b>2E2</b>	QVQLKESGPGGL VAPSQSLSTCT VSGFSLT (SEQ ID NO:25)	WVRQPPGKGLE WLG (SEQ ID NO:30)	RLSISKDNSKS QVFLKINSLQT DDTALYYCAR (SEQ ID NO:37)	WGQGTSTVTVS S (SEQ ID NO:44)
<b>2E2 RHA</b>	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCA ASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVS (SEQ ID NO:31)	RFTISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTSTVTVS S (SEQ ID NO:45)
<b>2E2 RHB</b>	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCA VSGFSLT	WVRQAPGKGL EWLG (SEQ ID NO:32)	RLSISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA	WGQGTSTVTVS S (SEQ ID NO:45)

	(SEQ ID NO:27)		R (SEQ ID NO:39)	
<b>2E2 RHC</b>	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCA VSGFSLT (SEQ ID NO:27)	WVRQAPGKGL EWVS (SEQ ID NO:31)	RFTISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
<b>2E2 RHD</b>	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCA ASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWLS (SEQ ID NO:33)	RFTISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
<b>2E2 RHE</b>	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCA ASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
<b>2E2 RHF</b>	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCA ASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVS (SEQ ID NO:31)	RLTISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:40)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
<b>2E2 RHG</b>	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCA ASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVS (SEQ ID NO:31)	RFSISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:41)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
<b>2E2 RHA2</b>	QVQLQESGPG VKPSETLSLTCT VSGGSIS (SEQ ID NO:28)	WIRQPPGKGLE WIG (SEQ ID NO:35)	RVTISVDTSKN QFSLKLSSVTA ADTAVYYCAR (SEQ ID NO:42)	WGQGTTLVTVS S (SEQ ID NO:46)
<b>2E2 RHB2</b>	QVQLQESGPG VKPSETLSLTCT VSGFSLT	WVRQPPGKGLE WLG (SEQ ID NO:36)	RLSISKDNSKN QVSLKLSSVTA ADTAVYYCAR	WGQGTTLVTVS S (SEQ ID NO:46)

	(SEQ ID NO:29)		(SEQ ID NO:43)	
<b>2E2 RHE S-G</b>	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCA ASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
<b>2E2 RHE E-D</b>	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCA ASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
<b>2E2 RHE Y-V</b>	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCA ASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
<b>2E2 RHE тройная</b>	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCA ASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGL EWVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
<b>Легкая цепь</b>	<b>FR1</b>	<b>FR2</b>	<b>FR3</b>	<b>FR4</b>
<b>2E2</b>	QIILTQSPAIMSA SPGEKVSITC (SEQ ID NO:47)	WFQQKPGTSPK LWIY (SEQ ID NO:50)	GVPVRFSGSGS GTSYSLTISRM EAEDAATYYC (SEQ ID NO:54)	FGSGTKLEIK (SEQ ID NO:59)
<b>RKA</b>	EIVLTQSPATLSL SPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGS GTDFTLTISLSE PEDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
<b>RKB</b>	EIILTQSPATLSL SPGERATLSC (SEQ ID NO:49)	WFQQKPGQAP RLWIY (SEQ ID NO:52)	GVPARFSGSGS GTDYTLTISSL EPEDFAVYYC	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)

			(SEQ ID NO:56)	
<b>RKC</b>	EIILTQSPATLSL SPGERATLSC (SEQ ID NO:49)	WFQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGS GTDFTLTISSE PEDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
<b>RKD</b>	EIVLTQSPATLSL SPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAP RLWIY (SEQ ID NO:52)	GIPARFSGSGS GTDFTLTISSE PEDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
<b>RKE</b>	EIVLTQSPATLSL SPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:51)	GVPARFSGSGS GTDFTLTISSE PEDFAVYYC (SEQ ID NO:57)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
<b>RKF</b>	EIVLTQSPATLSL SPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGS GTDYTLTISSL EPEDFAVYYC (SEQ ID NO:58)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
<b>RKG</b>	EIVLTQSPATLSL SPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WYQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:53)	GIPARFSGSGS GTDFTLTISSE PEDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
<b>RKA F-Y</b>	EIVLTQSPATLSL SPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGS GTDFTLTISSE PEDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
<b>RKF F-Y</b>	EIVLTQSPATLSL SPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGS GTDYTLTISSL EPEDFAVYYC (SEQ ID NO:58)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)

**Таблица 4.** Аминокислотные последовательности переменных областей антител

<b>Наименование антитела</b>	<b>Варибельная тяжелая цепь</b>	<b>Варибельная легкая цепь</b>
ch2C4	ch2C4 VH	ch2C4 VK

ch2E2	ch2E2 VH (SEQ ID NO:1)	ch2E2 VK (SEQ ID NO:15)
cVHKA	ch2E2 VH (SEQ ID NO:1)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
cVHKB	ch2E2 VH (SEQ ID NO:1)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HAcVK	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	ch2E2 VK (SEQ ID NO:15)
HBcVK	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	ch2E2 VK (SEQ ID NO:15)
HAKA	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HAKB	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HAKC	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HAKD	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HAKE	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HAKF	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HAKG	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HBKA	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HBKB	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HBKC	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HBKD	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HBKE	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HBKF	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HBKG	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HCKA	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HCKB	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HCKC	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HCKD	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HCKE	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HCKF	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HCKG	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HDKA	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)

HDKB	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HDKC	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HDKD	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HDKE	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HDKF	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HDKG	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HEKA	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HEKB	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HEKC	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HEKD	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HEKE	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HEKF	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HEKG	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HFKA	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HFKB	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HFKC	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HFKD	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HFKE	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HFKF	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HFKG	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HGKA	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HGKB	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HGKC	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HGKD	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HGKE	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HGKF	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HGHG	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)

HA2KA	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HA2KB	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HB2KA	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
HB2KB	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
HA2KF	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HB2KF	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HA2KC	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HA2KD	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HA2KE	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HA2KF	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
HA2KG	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
HB2KC	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
HB2KD	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
HB2KE	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
HA2KF <sub>myT</sub>	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKF F-Y <sub>myT</sub> (SEQ ID NO:24)
HB2KF <sub>myT</sub>	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKF F-Y <sub>myT</sub> (SEQ ID NO:24)
HEKA <sub>myT</sub>	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKA F-Y <sub>myT</sub> (SEQ ID NO:23)
HEKF <sub>myT</sub>	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKF F-Y <sub>myT</sub> (SEQ ID NO:24)
HAKF <sub>myT</sub>	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKF F-Y <sub>myT</sub> (SEQ ID NO:24)
HBKF <sub>myT</sub>	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKF F-Y <sub>myT</sub> (SEQ ID NO:24)
HCKF <sub>myT</sub>	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKF F-Y <sub>myT</sub> (SEQ ID NO:24)
HDKF <sub>myT</sub>	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKF F-Y <sub>myT</sub> (SEQ ID NO:24)
HFKF <sub>myT</sub>	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKF F-Y <sub>myT</sub> (SEQ ID NO:24)
HGKF <sub>myT</sub>	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKF F-Y <sub>myT</sub> (SEQ ID NO:24)

RHE Y-VKA	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
RHE Y-VKB	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
RHE Y-VKC	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
RHE Y-VKD	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
RHE Y-VKE	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
RHE Y-VKF	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
RHE Y-VKG	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
RHE E-DKA	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
RHE E-DKB	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
RHE E-DKC	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
RHE E-DKD	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
RHE E-DKE	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
RHE E-DKF	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
RHE E-DKG	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
RHE E-DKF <sub>мут</sub>	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKF F-Y <sub>мут</sub> (SEQ ID NO:24)
RHE S-GKA	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
RHE S-GKB	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
RHE S-GKC	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
RHE S-GKD	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
RHE S-GKE	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
RHE S-GKF	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
RHE S-GKG	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO:11)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
RHE Тройная-КА	2E2 RHE тройная (SEQ ID NO:14)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)

RHE Тройная-KB	2E2 RHE тройная (SEQ ID NO:14)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
RHE Тройная-KC	2E2 RHE тройная (SEQ ID NO:14)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
RHE Тройная-KD	2E2 RHE тройная (SEQ ID NO:14)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
RHE Тройная-KE	2E2 RHE тройная (SEQ ID NO:14)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
RHE Тройная-KF	2E2 RHE тройная (SEQ ID NO:14)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
RHE Тройная-KG	2E2 RHE тройная (SEQ ID NO:14)	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)
RHE Тройная-KFмут	2E2 RHE тройная (SEQ ID NO:14)	2E2 RKF F-Y мут (SEQ ID NO:24)
RHE Y-VKFмут	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKF F-Y мут (SEQ ID NO:24)
RHE E-DKFмут	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKF F-Y мут (SEQ ID NO:24)

Существуют пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющих тяжелые цепи, обозначенные  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$ , соответственно.  $\gamma$  и  $\alpha$  классы далее подразделяются на подклассы, *например*, люди экспрессируют следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IGA1 и IgA2. IgG1 антитела могут существовать во множестве полиморфных вариантов, называемых аллотипами (рассматривается в Jefferis and Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4 1-7), любой из которых подходит для использования в некоторых из вариантов осуществления в настоящем документе. Общие аллотипические варианты в человеческих популяциях обозначаются буквами a, f, n, z или их комбинациями. В любом из вариантов осуществления в настоящем документе, антитело может содержать Fc область тяжелой цепи, содержащую Fc область IgG человека. В дополнительных вариантах осуществления, Fc область IgG человека содержит IgG1 или IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления, антителом является IgG1 антитело. В некоторых вариантах осуществления, антителом является IgG4 антитело. В некоторых вариантах осуществления, IgG4 человека содержит аминокислотную замену S228P, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU индексом, как в Kabat. В некоторых вариантах осуществления, IgG1 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления, IgG4 человека содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 76 или 77. В некоторых вариантах осуществления, антитело может содержать тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело индуцирует апоптоз активированных эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело индуцирует апоптоз эозинофилов в состоянии покоя. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело истощает активированные эозинофилы и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело истощает или уменьшает количество тучных клеток и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело истощает или снижает количество тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело убивает тучные клетки за счет активности ADCC. В некоторых вариантах осуществления, антитело истощает или уменьшает количество тучных клеток, экспрессирующих Siglec-8, в ткани. В некоторых вариантах осуществления, антитело истощает или уменьшает количество тучных клеток, экспрессирующих Siglec-8, в биологической жидкости.

#### 1. Аффинность антитела

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

В одном варианте осуществления, аффинность связывания анти-Siglec-8 антитела может быть определена с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса. Например,  $K_d$  или значение  $K_d$  может быть измерено с применением BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C с чипами с иммобилизованным антигеном CM5 при ~10 единицах ответа (RU). Коротко, биосенсорные чипы карбоксиметилированного декстрана (CM5, BIAcore® Inc.) активируют гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика. Иммобилизованные антитела (например, анти-Fc человека) разводятся 10 мМ ацетатом натрия, pH 4,8, перед инъекцией со скоростью потока 30 мкл/минуту и дополнительно иммобилизуют анти-Siglec-8 антителом. Для

измерения кинетики двукратные серийные разведения димерного Siglec-8 вводят в PBS с 0,05% Tween 20 (PBST) при 25°C со скоростью потока примерно 25 мкл/мин. Скорости ассоциации ( $k_{on}$ ) и скорости диссоциации ( $k_{off}$ ) рассчитывают с использованием простой взаимнооднозначной модели связывания Ленгмюра (BIAcore® Evaluation Software version 3.2) путем одновременной подгонки сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесная константа диссоциации ( $K_d$ ) рассчитывается как отношение  $k_{off}/k_{on}$ . См., например, Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881.

В другом варианте осуществления, биослойная интерферометрия может использоваться для определения аффинности анти-Siglec-8 антител к Siglec-8. В типовом анализе, меченый белок Siglec-8-Fc иммобилизуют на анти-человеческих сенсорах захвата и инкубируют с увеличивающимися концентрациями мышинных, химерных или гуманизированных анти-Siglec-8 Fab фрагментов для получения измерений аффинности с использованием такого инструмента, как например, Octet Red 384 System (ForteBio).

Аффинность связывания анти-Siglec-8 антитела может, например, также быть определена анализом Скэтчарда, описанным в Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980) с использованием стандартных методик, хорошо известных в соответствующей области техники. См. также Scatchard, G., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660 (1947).

### 2. Авидность антител

В некоторых вариантах осуществления, авидность связывания анти-Siglec-8 антитела может быть определено с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса. Например,  $K_d$  или значение  $K_d$  можно измерить с помощью BIAcore T100. Иммобилизованные антитела (например, анти-человеческие Fc козы и анти-мышинные Fc козы) иммобилизуют на CM5 чипе. Проточные клетки могут быть иммобилизованы анти-человеческими или анти-мышинными антителами. Анализ проводят при определенной температуре и скорости потока, например, при 25°C при скорости потока 30 мкл/мин. Димерный Siglec-8 разводят в буфере для анализа до различных концентраций, например, в диапазоне концентраций от 15 нМ до 1,88 пМ. Антитела иммобилизуют и проводят высокоэффективные инъекции с последующими диссоциациями. Проточные клетки регенерируют с помощью буфера, например, 50 мМ глицина, pH 1,5. Результаты бланкируют пустой эталонной клеткой и множественными инъекциями буфера для анализа, и анализируются с использованием глобальных параметров соответствия 1:1.

### 3. Конкурентные анализы

Конкурентные анализы могут быть использованы для определения того, связываются ли два антитела с одним и тем же эпитопом через распознавание идентичных или пространственно перекрывающихся эпитопов или одно антитело конкурентно ингибирует связывание другого антитела с антигеном. Эти анализы известны в данной области техники. Обычно антиген или антигенэкспрессирующие клетки иммобилизуют на многолуночном планшете и измеряют способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител. Обычными метками для таких конкурентных анализов являются радиоактивные метки или ферментные метки. В некоторых вариантах

осуществления, анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе, конкурирует с 2E2 антителом, описанным в настоящем документе, за связывание с эпитопом, присутствующим на клеточной поверхности (*например*, тучной клетки). В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе, конкурирует с антителом, содержащим переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, за связывание с эпитопом, присутствующим на клеточной поверхности (*например*, тучной клетки). В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе, конкурирует с 2C4 антителом, описанным в настоящем документе, за связывание с эпитопом, присутствующим на клеточной поверхности (*например*, тучной клетки). В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе, конкурирует с антителом, содержащим переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (как найдено в патенте США № 8,207,305), и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (как найдено в патенте США № 8,207,305), для связывания с эпитопом, присутствующим на клеточной поверхности (*например*, тучной клетки).

#### 4. Термостабильность

В некоторых аспектах, анти-Siglec-8, описанное в настоящем документе, имеет температуру плавления ( $T_m$ ), по меньшей мере, примерно  $70^{\circ}\text{C}$ , по меньшей мере, примерно  $71^{\circ}\text{C}$  или, по меньшей мере, примерно  $72^{\circ}\text{C}$  в анализе теплового сдвига. В типовом анализе теплового сдвига образцы, содержащие гуманизованное анти-Siglec-8 антитело, инкубируют с флуоресцентным красителем (Sypro Orange) в течение 71 цикла с повышением температуры на  $1^{\circ}\text{C}$  за цикл в кПЦР термоциклере для определения  $T_m$ . В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело имеет аналогичную или более высокую  $T_m$  по сравнению с антителом 2E2 мыши и/или антителом 2C4 мыши. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16 или 21. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело имеет такую же или более высокую  $T_m$  по сравнению с химерным антителом 2C4. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело имеет такую же или более высокую  $T_m$  по сравнению с антителом, имеющим тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

#### 5. Анализы биологической активности

В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе, истощает эозинофилы и ингибирует тучные клетки. Анализы для оценки апоптоза клеток хорошо известны в данной области техники, например,

окрашивание аннексином V и анализ TUNNEL.

В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе, индуцирует активность ADCC. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе, убивает эозинофилы, экспрессирующие Siglec-8, за счет активности ADCC. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит не фукозилированные (*m.e.* афукозилированные) анти-Siglec-8 антитела. В некоторых вариантах осуществления, композиция, содержащая не фукозилированные анти-Siglec-8 антитела, описанные в настоящем документе, усиливает активность ADCC против эозинофилов, экспрессирующих Siglec-8, по сравнению с композицией, содержащей частично фукозилированные анти-Siglec-8 антитела. Анализы для оценки активности ADCC хорошо известны в данной области техники и описаны в настоящем документе. В типичном анализе для измерения активности ADCC используют эффекторные клетки и клетки-мишени. Примеры эффекторных клеток включают естественные киллеры (NK), большие гранулярные лимфоциты (LGL), лимфокин-активированные киллеры (LAK) и РВМС, содержащие NK и LGL, или лейкоциты, имеющие Fc рецепторы на поверхности клеток, таких как нейтрофилы, эозинофилы и макрофаги. Эффекторные клетки могут быть выделены из любого источника, включая индивидуумов с заболеванием, представляющим интерес (*например*, тучноклеточным гастритом, тучноклеточным эзофагитом, тучноклеточным колитом, тучноклеточным энтеритом, тучноклеточным дуоденитом и/или тучноклеточным гастроэнтеритом). Клеткой-мишенью является любая клетка, которая экспрессирует на клеточной поверхности антигены, которые могут распознаваться оцениваемыми антителами. Примером такой клетки-мишени является эозинофил, который экспрессирует Siglec-8 на клеточной поверхности. Другим примером такой клетки-мишени является линия клеток (*например*, линия клеток Ramos), которая экспрессирует Siglec-8 на поверхности клетки (*например*, Ramos 2C10)). Клетки-мишени могут быть мечены реагентом, который позволяет обнаруживать цитолиз. Примеры реагентов для мечения включают радиоактивное вещество, такое как хромат натрия ( $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ ). См., *например*, Immunology, 14, 181 (1968); J. Immunol. Methods., 172, 227 (1994); and J. Immunol. Methods., 184, 29 (1995).

В типовом анализе для оценки ADCC и апоптотической активности анти-Siglec-8 антител на тучных клетках, где тучные клетки человека выделяют из тканей человека или биологических жидкостей в соответствии с опубликованными протоколами (Guhl et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 2011, 75:382-384; Kulka et al., In Current Protocols in Immunology, 2001, (John Wiley & Sons, Inc.)) или дифференцируют из гемопоэтических стволовых клеток человека, например, как описано Yokoi et al., J Allergy Clin Immunol., 2008, 121:499-505. Очищенные тучные клетки ресуспендируют в полной среде RPMI в стерильном 96-луночном U-донном планшете и инкубируют в присутствии или в отсутствие анти-Siglec-8 антител в течение 30 мин при концентрациях в пределах от 0,0001 нг/мл и 10 мкг/мл. Образцы инкубируют в течение еще 4-48 часов с очищенными

естественными киллерами (NK) или свежими PBL и без них для индукции ADCC. Уничтожение клеток путем апоптоза или ADCC анализируют с помощью проточной цитометрии с применением флуоресцентных конъюгированных антител для обнаружения тучных клеток (CD117 и FcεR1) и аннексина-V и 7AAD для различения живых и мертвых или умирающих клеток. Окрашивание на аннексин-V и 7AAD проводят в соответствии с инструкциями производителя.

В некоторых аспектах, описанное в настоящем документе анти-Siglec-8 антитело ингибирует активность, опосредованную тучными клетками. Триптазу тучных клеток используют в качестве биомаркера для определения общего количества тучных клеток и их активации. Например, общая и активная триптаза, а также гистамин, N-метилгистамин и 11-бета-простагландин F2 могут быть измерены в крови или моче для оценки уменьшения тучных клеток. См., *например*, публикацию патентной заявки США № US 20110293631 для типового анализа активности тучных клеток.

#### *Е. Приготовление антител*

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

#### 1. Фрагменты антител.

Настоящее описание охватывает фрагменты антител. Фрагменты антител могут быть получены традиционными способами, такими как ферментативное переваривание, или рекомбинантными методами. В определенных обстоятельствах есть преимущества использования фрагментов антител, а не целых антител. Для обзора некоторых фрагментов антител см. Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134.

Были разработаны различные методы получения фрагментов антител. Традиционно эти фрагменты получают протеолитическим перевариванием интактных антител (см., например, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); и Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Однако, теперь эти фрагменты могут быть продуцированы непосредственно рекомбинантными клетками-хозяевами. Все фрагменты антител Fab, Fv и scFv могут экспрессироваться и секретироваться из E. coli, что позволяет легко продуцировать большие количества этих фрагментов. Фрагменты антител могут быть выделены из фаговых библиотек антитела, рассмотренного выше. Альтернативно, фрагменты Fab'-SH могут быть непосредственно восстановлены из E. coli и химически связаны с образованием фрагментов F(ab')<sub>2</sub> (Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). Согласно другому подходу, фрагменты F(ab')<sub>2</sub> могут быть выделены непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Fab и F(ab')<sub>2</sub> фрагмент с увеличенным периодом полужизни *in vivo*, содержащий остатки эпитопа, связывающего рецептор реутилизации, описаны в патенте США № 5,869,046. Другие методы получения фрагментов антител будут очевидны специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, антителом является одноцепочечный фрагмент Fv (scFv). См.

WO 93/16185; патенты США №№ 5,571,894; и 5,587,458. Fv и scFv являются единственными видами с интактными сайтами комбинирования, лишенными константных областей; таким образом, они могут подходить для снижения неспецифического связывания во время использования *in vivo*. Слитые белки scFv могут быть сконструированы для получения слияния эффекторного белка либо на amino-, либо на карбокси-конце scFv. См. *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, выше. Фрагмент антитела также может быть «линейным антителом», например, как описано в патенте США № 5641870, например. Такие линейные антитела могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

## 2. Гуманизированные антитела

Настоящее описание охватывает гуманизированные антитела. В данной области техники известны различные способы гуманизации не человеческих антител. Например, гуманизированное антитело может иметь один или несколько аминокислотных остатков, введенных в него из источника, не относящегося к человеку. Эти не человеческие аминокислотные остатки часто называют «импортными» остатками, которые обычно берутся из «импортного» переменного домена. Гуманизация может по существу проводиться согласно способу Винтера (Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven et al. (1988) *Science* 239:1534-1536), заменяя последовательности гипервариабельной области на соответствующие последовательности антитела человека. Соответственно, такие «гуманизированные» антитела являются химерными антителами (патент США № 4,816,567), где, по существу, менее чем интактный переменный домен человека, заменен соответствующей последовательностью из вида, не являющегося человеком. На практике, гуманизированные антитела обычно представляют собой антитела человека, в которых некоторые остатки гипервариабельной области и, возможно, некоторые остатки FR заменены остатками из аналогичных сайтов в антителах грызунов.

Выбор переменных доменов человека, как легких, так и тяжелых, для использования при получении гуманизированных антител может быть важным для снижения антигенности. В соответствии с так называемым способом «наилучшего соответствия», последовательность переменного домена антитела грызуна (например, мыши) подвергают скринингу против всей библиотеки известных последовательностей переменного домена человека. Последовательность человека, которая наиболее близка к последовательности грызуна, затем принимается в качестве каркаса человека для гуманизированного антитела (Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. В другом способе используют конкретную каркасную область, полученную из консенсусной последовательности всех антител человека конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Та же самая каркасная область может использоваться для нескольких различных гуманизированных антител (Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta et al. (1993) *J. Immunol.*, 151:2623.

Кроме того, обычно желательно, чтобы антитела были гуманизированы с

сохранением высокой аффинности к антигену и других благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели в соответствии с одним способом, гуманизированные антитела получают путем анализа родительских последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей родительских и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов широко доступны и знакомы специалистам в данной области техники. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают возможные трехмерные конформационные структуры выбранных кандидатных последовательностей иммуноглобулинов. Изучение этих изображений позволяет анализировать вероятную роль остатков в функционировании кандидатной последовательности иммуноглобулина, *т. е.* анализ остатков, которые влияют на способность кандидатного иммуноглобулина связывать свой антиген. Таким образом, FR остатки могут быть выбраны и объединены из реципиентной и импортируемой последовательностей, так что достигается желаемая характеристика антитела, такая как повышенная аффинность к антигенам-мишеням. В общем, остатки гипервариабельной области непосредственно и наиболее по существу влияют на связывание антигена.

### 3. Антитела человека

Анти-Siglec-8 антитело человека по настоящему изобретению может быть сконструировано объединением Fv клона последовательностей переменных доменов, выбранных из библиотек фагового дисплея, полученных от человека, с известными последовательностями константных доменов человека. Альтернативно, моноклональные анти-Siglec-8 антитела человека по настоящему описанию могут быть получены методом гибридомы. Клеточные линии миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека для продуцирования моноклональных антител человека описаны, например, у Kozbor J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); and Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

Возможно получить трансгенных животных (*например*, мышей), которые способны, после иммунизации, продуцировать полный набор антител человека в отсутствие продуцирования эндогенного иммуноглобулина. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена области объединения тяжелой цепи антитела (JH) у химерных мышей и мышей с мутантной зародышевой линией приводит к полному ингибированию продуцирования эндогенного антитела. Перенос массива генов иммуноглобулина зародышевой линии человека у таких мышей с мутантной зародышевой линией приведет к продуцированию антител человека при провокации антигеном. См., *например*, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

Генная перетасовка также может использоваться для получения антител человека из антител не человека (*например*, грызунов), где антитело человека имеет сходные аффинности и специфичности с исходным антителом не человека. В соответствии с этим

способом, который также называется «импринтинг эпитопа», вариабельная область тяжелой или легкой цепи фрагмента нечеловеческого антитела, полученного методами фагового дисплея, описанными в настоящем документе, заменяется репертуаром генов V-домена человека, создавая популяция химер scFv или Fab не человеческой цепи/цепи человека. Селекция с антигенами дает выделение химерного scFv или Fab не человеческой цепи/цепи человека, где цепь человека восстанавливает антигенсвязывающий сайт, разрушенный при удалении соответствующей не человеческой цепи в клоне первичного фагового дисплея, *т.е.* эпитоп управляет выбором партнера цепи человека. Когда процесс повторяется для замены оставшейся не человеческой цепи, получают антитело человека (см. РСТ WO 93/06213, опубликованную 1 апреля 1993). В отличие от традиционной гуманизации не человеческих антител через трансплантацию CDR, этот метод дает полностью антитело человека, которые не имеют FR или CDR остатков не человеческого происхождения.

#### 4. Биспецифические антитела.

Биспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, которые обладают специфичностью связывания, по меньшей мере, с двумя разными антигенами. В некоторых вариантах осуществления, биспецифические антитела представляют собой человеческие или гуманизированные антитела. В некоторых вариантах осуществления, одна из специфичностей связывания относится к Siglec-8, а другая, к любому другому антигену. В некоторых вариантах осуществления, биспецифические антитела могут связываться с двумя разными эпитопами Siglec-8. Биспецифические антитела также можно использовать для локализации цитотоксических агентов в клетках, экспрессирующих Siglec-8. Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, F(ab')<sub>2</sub> биспецифических антител).

Способы получения биспецифических антител известны в данной области техники. См. Milstein and Cuello, Nature, 305: 537 (1983), WO 93/08829 published May 13, 1993 и Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655 (1991). Для получения дополнительных сведений о создании биспецифических антител см., например, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986). Биспецифические антитела включают перекрестно-сшитые или «гетероконъюгированные» антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть сопряжено с авидином, другое с биотином. Гетероконъюгированные антитела можно получить с использованием любого удобного способа перекрестного сшивания. Подходящие перекрестно-сшивающие агенты хорошо известны в данной области техники и описаны в патенте США № 4,676,980, вместе с множеством способов перекрестного сшивания.

#### 5. Однодоменные антитела.

В некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему описанию представляет собой однодоменное антитело. Однодоменное антитело представляет собой одиночную полипептидную цепь, содержащую весь или часть вариабельного домена

тяжелой цепи или весь или часть вариабельного домена легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления, однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; см., например, патент США № 6,248,516 В1). В одном варианте осуществления, однодоменное антитело состоит из всего или части вариабельного домена тяжелой цепи антитела.

#### 6. Варианты антител

В некоторых вариантах осуществления предусмотрены модификации аминокислотной последовательности описанных в настоящем документе антител. Например, может быть желательно улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела могут быть получены путем внесения соответствующих изменений в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Любая комбинация делеции, вставки и замены может быть использована для получения конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает желаемыми характеристиками. Аминокислотные изменения могут быть введены в аминокислотную последовательность рассматриваемого антитела во время создания этой последовательности.

Полезный способ идентификации определенных остатков или областей антитела, которые являются предпочтительными положениями для мутагенеза, называется «аланин-сканирующий мутагенез», как описано у Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. В настоящем документе, остаток или группа остатков-мишеней идентифицируют (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) и заменяют нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином), чтобы повлиять на взаимодействие аминокислот с антигеном. Те положения аминокислот, которые демонстрируют функциональную чувствительность к заменам, затем уточняются путем введения дополнительных или других вариантов на, или для, сайтов замены. Таким образом, хотя сайт для введения вариации аминокислотной последовательности предопределен, природа мутации как таковая необязательно должна быть предопределена. Например, для анализа эффективности мутации в данном сайте, аланисканирование или случайный мутагенез проводят в целевом кодоне или области, и экспрессированные иммуноглобулины проверяют на желаемую активность.

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

В некоторых вариантах осуществления, моноклональные антитела имеют C-

концевое расщепление тяжелой цепи и/или легкой цепи. Например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков отщепляются на С-конце тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления С-концевое расщепление удаляет С-концевой лизин из тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления, моноклональные антитела имеют N-концевое расщепление тяжелой цепи и/или легкой цепи. Например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков отщепляются на N-конце тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления, усеченные формы моноклональных антител могут быть получены рекомбинантными методами.

В некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему описанию изменяют для увеличения или уменьшения степени гликозилирования антитела. Гликозилирование полипептидов обычно является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводной группы к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-Х-серин и аспарагин-Х-треонин, где Х представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводной группы к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикарбонильной группе, чаще всего к серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Добавление или делеция сайтов гликозилирования в антителе удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, что одна или несколько из описанных выше последовательностей трипептида (для N-связанных сайтов гликозилирования) создаются или удаляются. Изменение также может быть выполнено путем добавления, делеции или замены одного или нескольких остатков серина или треонина в последовательности исходного антитела (для сайтов O-связанного гликозилирования).

Если антитело содержит Fc область, углеводов, присоединенный к ней, может быть изменен. Например, антитела со зрелой углеводной структурой, в которой отсутствует фукоза, присоединенная к Fc области антитела, описаны в заявке на патент США № US 2003/0157108 (Presta, L.). См. также US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Антитела с разделенным пополам N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) в углеводе, присоединенном к Fc области антитела, упоминаются в WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. и патенте США № 6,602,684, Umana et al. Антитела с, по меньшей мере, одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc области антитела, описаны в WO 1997/30087, Patel et al. См. также WO 1998/58964 (Raju, S.) и WO 1999/22764 (Raju, S.), касающиеся антител с измененным углеводом, присоединенным к их Fc области. См. также US 2005/0123546 (Umana et al.) относительно антигенсвязывающих молекул с модифицированным гликозилированием.

В некоторых вариантах осуществления, вариант гликозилирования содержит Fc область, где в углеводной структуре, присоединенной к Fc области, отсутствует фукоза. В таких вариантах улучшена функция ADCC. Необязательно, Fc область дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных замен в ней, которые дополнительно улучшают ADCC, например, замены в положениях 298, 333 и/или 334 Fc области (нумерация остатков EU). Примеры публикаций, относящихся к «дефукозилированным» или «фукоза-дефицитным» антителам, включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Примеры клеточных линий, продуцирующих дефукозилированные антитела, включают клетки Lec13 CHO, дефицитные по фукозилированию белка (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986); заявка на патент США № US 2003/0157108 A1, Presta, L; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., особенно в примере 11), и линии нокаутированных клеток, таких как ген альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8, нокаутированные клетки CHO (Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)), и клетки, сверхэкспрессирующие  $\beta$ 1,4-N-ацетилгликозилтрансферазу III (GnT-III) и  $\mu$ -маннозидазу II Гольджи (ManII).

Антитела, рассматриваемые в настоящем документе, которые снижают фукозу по отношению к количеству фукозы на том же антителе, продуцированном в CHO клетках дикого типа. Например, антитело имеет меньшее количество фукозы, чем если бы оно продуцировалось нативными клетками CHO (например, клеткой CHO, которая продуцирует нативный паттерн гликозилирования, такой как клетка CHO, содержащая нативный ген FUT8). В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело, представленное в настоящем документе, представляет собой антитело, в котором менее примерно 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% или 1% N-связанных гликанов на нем содержат фукозу. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело, представленное в настоящем документе, представляет собой антитело, в котором ни один из N-связанных гликанов на нем не содержит фукозу, т.е. где антитело полностью не содержит фукозу, или не содержит фукозу, или является не фукозилированным или афукозилированным. Количество фукозы можно определить путем вычисления среднего количества фукозы в сахарной цепи в Asn297 относительно суммы всех гликоструктур, присоединенных к Asn297 (например, сложных, гибридных и высокоманнозных структур), по данным масс-спектрометрии MALDI-TOF, как описано, например, в WO 2008/077546. Asn297 относится к остатку аспарагина, расположенному примерно в положении 297 в Fc области (EU нумерация остатков Fc области); однако Asn297 также может располагаться примерно на  $\pm 3$  аминокислоты выше или ниже положения 297, то есть между положениями 294 и 300, из-за незначительных вариаций последовательности в антителах. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела не фукозилированы.

В одном варианте осуществления, антитело изменяют для увеличения его периода полужизни в сыворотке. Для увеличения периода полужизни антитела в сыворотке можно включить эпитоп, связывающий рецептор реутилизации, в антитело (особенно во фрагмент антитела), как описано в патенте США № 5,739,277, например. В настоящем документе, термин «эпитоп, связывающий рецептор реутилизации» относится к эпитопу Fc области молекулы IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), который отвечает за увеличение периода полужизни *in vivo* в сыворотке Молекула IgG (US 2003/0190311, патент США № 6,821,505; патент США № 6,165,745; патент США № 5,624,821; патент США № 5,648,260; патент США № 6,165,745; патент США № 5,834,597).

Другой тип варианта представляет собой вариант с аминокислотной заменой. В этих вариантах, по меньшей мере, один аминокислотный остаток в молекуле антитела заменен другим остатком. Сайты, представляющие интерес для замещающего мутагенеза, включают гипервариабельные области, но также рассматриваются изменения FR. Консервативные замены показаны в таблице 5 под заголовком «предпочтительные замены». Если такие замены приводят к желаемому изменению биологической активности, тогда могут быть внесены более существенные изменения, обозначенные «типowymi заменами» в таблице 5 или как дополнительно описано ниже со ссылкой на классы аминокислот, и продукты подвергают скринингу.

**Таблица 5.**

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

Существенные модификации биологических свойств антитела достигаются путем

выбора замен, которые значительно различаются по своему влиянию на поддержание (a) структуры полипептидного скелета в области замены, например, в виде плоской или спиральной конформации, (b) заряд или гидрофобность молекулы в целевом сайте, или с) основной части боковой цепи. Аминокислоты могут быть сгруппированы в соответствии со сходством свойств их боковых цепей (в A. L. Lehninger, in *Biochemistry*, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

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

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

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

Неконсервативные замены могут повлечь за собой замену члена одного из этих классов на другой класс. Такие замещенные остатки также могут быть введены в сайты консервативных замен или в оставшиеся (неконсервативные) сайты.

Один тип варианта замены включает замену одного или нескольких остатков гипервариабельной области родительского антитела (например, гуманизированного или антитела человека). Как правило, полученные в результате варианты, выбранные для дальнейшего развития, будут иметь модифицированные (например, улучшенные) биологические свойства по сравнению с исходным антителом, из которого они получены. Удобный способ создания таких вариантов замены включает созревание аффинности с использованием фагового дисплея. Коротко, несколько сайтов гипервариабельной области (например, 6-7 сайтов) мутируют для создания всех возможных аминокислотных замен в каждом сайте. Образованные таким образом антитела экспонируют из частиц нитчатого фага в виде слияний, по меньшей мере, с частью белка оболочки фага (например, продукта гена III M13), упакованного в каждой частице. Затем варианты, экспонированные на фаге, подвергают скринингу на их биологическую активность (например, аффинность связывания). Чтобы идентифицировать сайты-кандидаты гипервариабельной области для модификации, может быть проведен сканирующий мутагенез (например, сканирование аланина) для идентификации остатков гипервариабельной области, вносящих значительный вклад в связывание антигена. Альтернативно или дополнительно, может быть полезным проанализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для определения точек контакта

между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами на замену согласно методикам, известным в данной области техники, включая разработанные в настоящем документе. После создания таких вариантов, панель вариантов подвергают скринингу с использованием методов, известных в данной области техники, включая описанные в настоящем документе, и антитела с превосходными свойствами в одном или нескольких соответствующих анализах могут быть отобраны для дальнейшей разработки.

Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая аминокислотную последовательность вариантов антитела, получают с помощью различных способов, известных в данной области техники. Эти способы включают, но не ограничены ими, выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотной последовательности) или получение с помощью олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, ПЦР мутагенеза и касетного мутагенеза заранее приготовленного варианта или не вариантной версии антитела.

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

В соответствии с этим описанием и идеями в данной области техники предполагается, что в некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему описанию может содержать одно или несколько изменений по сравнению с аналогичным антителом дикого типа, например, в Fc области. Эти антитела, тем не менее, сохраняют по существу те же характеристики, которые требуются для терапевтического применения, по сравнению с их аналогами дикого типа. Например, считается, что определенные изменения могут быть внесены в Fc область, которые приведут к измененному (т.е. улучшенному или уменьшенному) связыванию C1q и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в WO99/51642. См. также Duncan & Winter *Nature* 322:738-40 (1988); патент США № 5,648,260; патент США № 5,624,821; и WO94/29351, касающиеся других примеров вариантов Fc области. WO00/42072 (Presta) и WO 2004/056312 (Lowman) описывают варианты антител с улучшенным или уменьшенным связыванием с FcR. Содержание этих патентных публикаций специально включено сюда посредством ссылки. См. также Shields et al. *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001). Антитела с увеличенным периодом полужизни и улучшенным связыванием с неонатальным рецептором Fc (FcRn), который отвечает за передачу материнских IgG плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)),

описаны в US 2005/0014934 A1 (Hinton et al.). Эти антитела содержат Fc область с одной или несколькими заменами в ней, которые улучшают связывание Fc области с FcRn. Варианты полипептидов с измененными аминокислотными последовательностями Fc области и повышенной или пониженной способностью связывания C1q описаны в патенте США № 6,194,551B1, WO99/51642. Содержание этих патентных публикаций специально включено в настоящий документ посредством ссылки. См. также Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

#### 7. Векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные методы.

Для рекомбинантного продуцирования антитела по настоящему изобретению нуклеиновую кислоту, кодирующую его, выделяют и вставляют в реплицируемый вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. ДНК, кодирующая антитело, легко выделяется и секвенируется с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных проб, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела). Доступно множество векторов. Выбор вектора частично зависит от используемой клетки-хозяина. Обычно клетки-хозяева имеют прокариотическое или эукариотическое (как правило, млекопитающее) происхождение. Следует понимать, что для этой цели можно использовать константные области любого изотипа, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области могут быть получены от любого вида человека или животного.

#### **Создание антител с использованием прокариотических клеток-хозяев:**

##### а) Конструирование вектора

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные компоненты антитела по настоящему описанию, могут быть получены с использованием стандартных рекомбинантных методик. Желаемые полинуклеотидные последовательности могут быть выделены и секвенированы из клеток, продуцирующих антитела, таких как клетки гибридомы. Альтернативно, полинуклеотиды могут быть синтезированы с использованием синтезатора нуклеотидов или методов ПЦР. После получения, последовательности, кодирующие полипептиды, вставляют в рекомбинантный вектор, способный реплицироваться и экспрессировать гетерологичные полинуклеотиды в прокариотических хозяевах. Многие векторы, которые доступны и известны в данной области техники, могут применяться для целей настоящего описания. Выбор подходящего вектора будет зависеть, главным образом, от размера нуклеиновых кислот, которые нужно вставить в вектор, и конкретной клетки-хозяина, трансформируемой вектором. Каждый вектор содержит различные компоненты в зависимости от его функции (амплификация или экспрессия гетерологичного полинуклеотида или того и другого) и его совместимости с конкретной клеткой-хозяином, в которой он находится. Компоненты вектора обычно включают, но не ограничиваются ими: точку начала репликации, ген маркера селекции, промотор, сайт связывания рибосомы (RBS), сигнальную последовательность, вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты и последовательность терминации транскрипции.

В общем, плазмидные векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, которые получены из видов, совместимых с клеткой-хозяином, используют в связи с этими хозяевами. Вектор обычно несет сайт репликации, а также маркирующие последовательности, которые способны обеспечивать фенотипическую селекцию в трансформированных клетках. Например, *E. coli* обычно трансформируют с использованием рBR322, плазмиды, полученной из видов *E. coli*. рBR322 содержит гены, кодирующие резистентность к ампициллину (Amp) и тетрациклину (Tet), и, таким образом, предоставляет простые средства для идентификации трансформированных клеток. рBR322, ее производные или другие микробные плазмиды или бактериофаги также могут содержать, или быть модифицированными для содержания, промоторы, которые могут использоваться микробным организмом для экспрессии эндогенных белков. Примеры производных рBR322, используемых для экспрессии конкретных антител, подробно описаны у Carter et al., патент США № 5,648,237.

Кроме того, фаговые векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, которые совместимы с микроорганизмом-хозяином, могут использоваться в качестве трансформирующих векторов в связи с этими хозяевами. Например, бактериофаг, такой как  $\lambda$ GEM.TM.-11, может применяться для создания рекомбинантного вектора, который может применяться для трансформации чувствительных клеток-хозяев, таких как *E. coli* LE392.

Вектор экспрессии по настоящему изобретению может содержать две или несколько пар промотор-цистрон, кодирующих каждый из полипептидных компонентов. Промотором является нетранслируемая регуляторная последовательность, расположенная выше (5') цистрона, который модулирует ее экспрессию. Прокариотические промоторы обычно делятся на два класса: индуцируемые и конститутивные. Индуцируемым промотором является промотор, который инициирует повышенные уровни транскрипции цистрона, находящегося под его контролем, в ответ на изменения условий культивирования, например присутствие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры.

Большое число промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами хорошо известно. Выбранный промотор может быть функционально связан с ДНК цистрона, кодирующей легкую или тяжелую цепь, путем удаления промотора из исходной ДНК посредством расщепления рестрикционным ферментом и вставки выделенной промоторной последовательности в вектор по настоящему описанию. Как последовательность нативного промотора, так и многие гетерологичные промоторы могут использоваться для направления амплификации и/или экспрессии генов-мишеней. В некоторых вариантах осуществления, изобретения используются гетерологичные промоторы, поскольку они обычно обеспечивают большую транскрипцию и более высокий выход экспрессируемого гена-мишени по сравнению с промотором нативного полипептида-мишени.

Промоторы, подходящие для использования в прокариотических хозяевах,

включают промотор PhoA,  $\beta$ -галактамазу и промоторные системы лактозы, промоторную систему триптофана (Trp) и гибридные промоторы, такие как tac или trc промотор. Однако также подходят другие промоторы, которые функциональны в бактериях (такие как другие известные бактериальные или фаговые промоторы). Их нуклеотидные последовательности были опубликованы, что позволяет специалисту в данной области техники функционально лигировать их с цистронами, кодирующими легкую и тяжелую цепи-мишени (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269), используя линкеры или адаптеры для обеспечения любых необходимых сайтов рестрикции.

В одном из аспектов настоящего описания, каждый цистрон в рекомбинантном векторе содержит компонент последовательности сигнала секреции, который направляет транслокацию экспрессируемых полипептидов через мембрану. В общем, сигнальная последовательность может быть компонентом вектора, или она может быть частью ДНК полипептида-мишени, которая вставлена в вектор. Сигнальная последовательность, выбранная для целей настоящего описания, должна быть такой, которая распознается и обрабатывается (т.е. расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не обрабатывают сигнальные последовательности, нативные для гетерологичных полипептидов, сигнальная последовательность заменяется прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы, состоящей из щелочной фосфатазы, пенициллиназы, Ipp или термостабильных лидеров энтеротоксина II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA и MBP. В одном варианте настоящего изобретения, сигнальные последовательности, используемые в обоих цистронах системы экспрессии, представляют собой сигнальные последовательности STII или их варианты.

В другом аспекте, продуцирование иммуноглобулинов согласно настоящему описанию может происходить в цитоплазме клетки-хозяина и, следовательно, не требует присутствия последовательностей сигнала секреции в каждом цистроне. В этом отношении, легкие и тяжелые цепи иммуноглобулина экспрессируются, складываются и собираются с образованием функциональных иммуноглобулинов в цитоплазме. Определенные штаммы-хозяева (например, trxB-штаммы *E. coli*) обеспечивают цитоплазматические условия, благоприятные для образования дисульфидной связи, тем самым обеспечивая надлежащую укладку и сборку экспрессируемых белковых субъединиц. Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

Антитела по настоящему изобретению также могут быть продуцированы с использованием системы экспрессии, в которой можно модулировать количественное соотношение экспрессируемых полипептидных компонентов, чтобы максимизировать выход секретлируемых и правильно собранных антител по настоящему описанию. Такая модуляция достигается, по меньшей мере, частично, путем одновременной модуляции трансляционной силы полипептидных компонентов.

Один метод модулирования трансляционной силы описан в Simmons et al., патент США № 5,840,523. Он использует варианты области инициации трансляции (TIR) внутри

цистрона. Для данной TIR может быть создана серия вариантов последовательности аминокислоты или нуклеиновой кислоты с диапазоном трансляционных сил, тем самым обеспечивая удобные средства для корректировки этого фактора для желаемого уровня экспрессии конкретной цепи. Варианты TIR могут быть созданы с помощью обычных методов мутагенеза, которые приводят к изменениям кодонов, которые могут изменять аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления, изменения в нуклеотидной последовательности являются «молчащими». Изменения в TIR могут включать, например, изменения в количестве или интервале последовательностей Шайна-Дальгарно, а также изменения в сигнальной последовательности. Одним из способов создания мутантных сигнальных последовательностей является создание «банка кодонов» в начале кодирующей последовательности, которая не изменяет аминокислотную последовательность сигнальной последовательности (т.е. изменения являются «молчащими»). Это может быть достигнуто путем изменения третьего положения нуклеотида каждого кодона; кроме того, некоторые аминокислоты, такие как лейцин, серин и аргинин, имеют несколько первых и вторых положений, что может усложнить создание банка. Этот способ мутагенеза подробно описан в Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158.

В одном варианте осуществления, создается набор векторов с диапазоном значений TIR для каждого цистрона в нем. Этот ограниченный набор обеспечивает сравнение уровней экспрессии каждой цепи, а также выход желаемых продуктов антител при различных комбинациях силы TIR. Силы TIR могут быть определены путем количественной оценки уровня экспрессии репортерного гена, как подробно описано в Simmons et al. патент США № 5,840,523. На основе сравнения трансляционной силы выбирают желаемые индивидуальные TIR для объединения в конструкции вектора экспрессии согласно настоящему описанию.

Прокариотические клетки-хозяева, подходящие для экспрессии антител по настоящему описанию, включают Archaeobacteria и Eubacteria, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы. Примеры полезных бактерий включают Escherichia (например, E. coli), Bacilli (например, B. subtilis), Enterobacteria, виды Pseudomonas (например, P. aeruginosa), Salmonella typhimurium, Serratia marcescans, Klebsiella, Proteus, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla или Paracoccus. В одном варианте осуществления, используют грамотрицательные клетки. В одном варианте осуществления, клетки E. coli используют в качестве хозяев для настоящего описания. Примеры штаммов E. coli включают штамм W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC Deposit No. 27,325) и его производные, включая штамм 33D3, имеющий генотип W3110  $\Delta$ hnuA ( $\Delta$ tonA) ptr3 lac Iq lacL8  $\Delta$ ompT $\Delta$ (nmpc-fepE) degP41 kanR (патент США № 5,639,635). Также подходят другие штаммы и их производные, такие как E. coli 294 (ATCC 31,446), E. coli B, E. coli  $\lambda$  1776 (ATCC 31,537) и E. coli RV308 (ATCC 31,608). Эти примеры являются скорее иллюстративными, чем ограничивающими. Способы

конструирования производных любых из вышеупомянутых бактерий, имеющих определенные генотипы, известны в данной области техники и описаны, например, у Bass et al., *Proteins*, 8:309-314 (1990). Обычно необходимо выбирать подходящие бактерии, принимая во внимание воспроизводимость репликона в клетках бактерии. Например, виды *E. coli*, *Serratia* или *Salmonella* могут быть подходящим образом использованы в качестве хозяина, если для доставки репликона используют хорошо известные плазмиды, такие как pBR322, pBR325, pACYC177 или pKN410. Обычно клетка-хозяин должна секретировать минимальные количества протеолитических ферментов, и в культуру клеток по желанию могут быть включены дополнительные ингибиторы протеаз.

#### б) Продуцирование антитела

Клетки-хозяева трансформируют вышеописанными векторами экспрессии и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

Трансформация означает введение ДНК в прокариотического хозяина так, чтобы ДНК могла реплицироваться, либо как внехромосомный элемент, либо за счет хромосомного интегранта. В зависимости от используемой клетки-хозяина трансформацию проводят стандартными методами, подходящими для таких клеток. Обработку кальцием с применением хлорида кальция обычно используют для бактериальных клеток, которые содержат существенные барьеры клеточной оболочки. В другом способе трансформации используют полиэтиленгликоль/ДМСО. Еще одним применяемым методом является электропорация.

Прокариотические клетки, используемые для получения полипептидов по настоящему изобретению, выращивают в среде, известной в данной области техники и подходящей для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры подходящей среды включают среду Лурия (LB) плюс необходимые питательные добавки. В некоторых вариантах осуществления, среда также содержит агент селекции, выбранный на основе конструкции вектора экспрессии, чтобы селективно разрешить рост прокариотических клеток, содержащих вектор экспрессии. Например, ампициллин добавляют в среду для роста клеток, экспрессирующих ген резистентности к ампициллину.

Любые необходимые добавки, помимо источников углерода, азота и неорганического фосфата, также могут быть включены в соответствующих концентрациях, введенных отдельно или в смеси с другой добавкой или средой, такой как комплексный источник азота. Необязательно, культуральная среда может содержать один или несколько восстанавливающих агентов, выбранных из группы, состоящей из глутатиона, цистеина, цистамина, тиогликолята, дитиоэритрита и дитиотреитола.

Прокариотические клетки-хозяева культивируют при подходящих температурах. В некоторых вариантах осуществления, для роста *E. coli* температура роста варьируется от примерно 20°C до примерно 39°C; от примерно 25°C до примерно 37°C; или примерно 30°C. pH среды может быть любым pH в диапазоне от примерно 5 до примерно 9, в

зависимости, главным образом, от организма-хозяина. В некоторых вариантах осуществления, для *E. coli*, рН составляет от примерно 6,8 до примерно 7,4, или примерно 7,0.

Если индуцируемый промотор используют в векторе экспрессии по настоящему описанию, экспрессия белка индуцируется в условиях, подходящих для активации промотора. В одном аспекте настоящего описания, *PhoA* промоторы используют для контроля транскрипции полипептидов. Соответственно, трансформированные клетки-хозяева культивируют в фосфат-лимитирующей среде для индукции. В некоторых вариантах осуществления, фосфат-лимитирующей средой является *S.R.A.P.* среда (см, например, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). В зависимости от используемой векторной конструкции можно использовать множество других индукторов, как известно в данной области техники.

В одном варианте осуществления, экспрессированные полипептиды по настоящему описанию секретируются в периплазму клеток-хозяев и восстанавливаются из нее. Восстановление белка обычно включает разрушение микроорганизма, как правило, такими способами, как осмотический шок, обработка ультразвуком или лизис. После разрушения клеток, клеточный дебрис или целые клетки могут быть удалены центрифугированием или фильтрацией. Белки могут быть дополнительно очищены, например, с помощью хроматографии на аффинной смоле. Альтернативно, белки могут быть транспортированы в культуральную среду и выделены в ней. Клетки могут быть удалены из культуры, и супернатант культуры отфильтрован и концентрирован для дальнейшей очистки продуцированных белков. Экспрессированные полипептиды могут быть дополнительно выделены и идентифицированы с использованием общеизвестных способов, таких как электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE) и Вестерн-блоттинга.

В одном из аспектов настоящего описания, продуцирование антител в больших количествах проводят в процессе ферментации. Для получения рекомбинантных белков доступны различные процедуры крупномасштабной ферментации с периодической подкормкой. Крупномасштабные ферментации имеют емкость, по меньшей мере, 1000 литров, а в некоторых вариантах осуществления, емкость от приблизительно 1000 до 100000 литров. В этих ферментерах используют лопастные мешалки для распределения кислорода и питательных веществ, особенно глюкозы. Мелкомасштабная ферментация обычно относится к ферментации в ферментере с объемной емкостью не более примерно 100 литров и может составлять от примерно 1 литра до примерно 100 литров.

В процессе ферментации индукция экспрессии белка обычно начинается после того, как клетки были выращены в подходящих условиях до желаемой плотности, например, OD550 примерно 180-220, на этой стадии клетки находятся в ранней стационарной фазе. В зависимости от используемой векторной конструкции могут использоваться различные индукторы, как известно в данной области техники и описано выше. Перед индукцией клетки могут быть выращены в течение более коротких периодов времени. Клетки обычно индуцируют в течение примерно 12-50 часов, хотя можно

использовать более длительное или более короткое время индукции.

Для улучшения выхода продуцирования и качество полипептидов по настоящему описанию, можно модифицировать различные условия ферментации. Например, для улучшения правильной сборки и укладки секретированных полипептидов антител, дополнительные векторы, сверхэкспрессирующие белки теплового шока, такие как белки Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD и/или DsbG) или FkpA (пептидилпролил цис, транс-изомеразы с активностью белка теплового шока) могут быть использованы для совместной трансформации прокариотических клеток-хозяев. Было продемонстрировано, что белки теплового шока способствуют правильной укладке и растворимости гетерологичных белков, продуцируемых в бактериальных клетках-хозяевах. Chen et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:19601-19605; Georgiou et al., патент США № 6,083,715; Georgiou et al., патент США № 6,027,888; Bothmann and Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie et al. (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

Чтобы минимизировать протеолиз экспрессированных гетерологичных белков (особенно тех, которые протеолитически чувствительны), в настоящем описании можно использовать определенные штаммы-хозяева, дефицитные по протеолитическим ферментам. Например, штаммы клеток-хозяев могут быть модифицированы для воздействия на генетические мутации в генах, кодирующих известные бактериальные протеазы, такие как протеаза III, OmpT, DegP, Tsp, протеаза I, протеаза Mi, протеаза V, протеаза VI и их комбинации. Некоторые штаммы *E. coli* с дефицитом протеазы доступны и описаны, например, в Joly et al. (1998), выше; Georgiou et al., патент США № 5,264,365; Georgiou et al., патент США № 5,508,192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

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

### с) Очистка антител

В одном варианте осуществления, полученный в настоящем документе белок антитела дополнительно очищают для получения препаратов, которые являются по существу гомогенными для дальнейших анализов и применений. Могут быть использованы стандартные способы очистки белков, известные в данной области техники. Следующие процедуры являются типовыми подходящими процедурами очистки: фракционирование на иммуноаффинных или ионообменных колонках, осаждение этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматография на диоксиде кремния или на катионообменной смоле, такой как DEAE, хроматофокусирование, SDS-PAGE, осаждение сульфатом аммония, и гель-фильтрация с использованием, например, Sephadex G-75.

В одном аспекте, Белок А, иммобилизованный на твердой фазе, используют для иммуноаффинной очистки продуктов антител по настоящему описанию. Белком А

является белок клеточной оболочки размером 41 кДа из *Staphylococcus aureus*, который с высокой аффинностью связывается с Fc областью антител. Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13. Твердой фазой, на которой иммобилизован Белок А, может быть колонка, содержащая поверхность из стекла или диоксида кремния, или стеклянной колонкой с регулируемыми порами, или колонкой с кремниевой кислотой. В некоторых вариантах применения, колонка покрывается реагентом, таким как глицерин, чтобы предотвратить неспецифическое прилипание загрязняющих веществ.

В качестве первой стадии очистки, препарат, полученный из культуры клеток, как описано выше, может быть нанесен на твердую фазу с иммобилизованным Белком А, чтобы обеспечить специфическое связывание антитела, представляющего интерес, с Белком А. Затем твердую фазу промывают для удаления загрязняющих веществ, неспецифически связанных с твердой фазой. Наконец, антитело, представляющее интерес, восстанавливают из твердой фазы элюированием.

#### **Создание антител с использованием эукариотических клеток-хозяев:**

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

##### **а) Компонент сигнальной последовательности**

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

##### **б) Точка начала репликации**

Обычно компонент точки начала репликации не требуется для векторов экспрессии млекопитающих. Например, точку начала SV40 обычно можно использовать только потому, что он содержит ранний промотор.

##### **с) Компонент гена селекции**

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

В одном примере схемы селекции используют лекарственное средство для

остановки роста клетки-хозяина. Те клетки, которые успешно трансформированы гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий лекарственную резистентность, и, таким образом, выживают в режиме селекции. В примерах такой доминирующей селекции используют лекарственные средства неомицин, микофеноловую кислоту и гигромицин.

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

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

Альтернативно, клетки-хозяева (особенно хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR) трансформированные или котрансформированные последовательностями ДНК, кодирующими антитело, белок DHFR дикого типа и другой селективируемый маркер, такой как аминокликозид 3'-фосфотрансфераза (APH), могут быть отобраны путем роста клеток в среде, содержащей агент селекции для селективируемого маркера, такого как аминокликозидный антибиотик, например канамицин, неомицин или G418. См. патент США № 4,965,199. Клетки-хозяева могут включать NS0, CHOK1, CHOK1SV или производные, включая клеточные линии, дефицитные по глутаминсинтетазе (GS). Способы использования GS в качестве селективируемого маркера для клеток млекопитающих описаны в патенте США № 5,122,464 и патенте США № 5,891,693.

#### d) Промоторный компонент

Векторы экспрессии и клонирования обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, представляющий интерес (например, антитело). Для эукариотов известны промоторные последовательности. Например, практически все эукариотические гены имеют богатую АТ область, расположенную примерно на 25-30 оснований выше сайта, где начинается транскрипция. Другой последовательностью, обнаруженной на 70-80 оснований выше точки начала транскрипции многих генов, является область CNCAAT, где N может быть любым нуклеотидом. На 3'-конце большинства эукариотических генов находится последовательность AATAAA, которая может быть сигналом для добавления поли А хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления, любая или все из этих последовательностей могут быть подходящим образом вставлены в эукариотические векторы экспрессии.

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

Ранние и поздние промоторы вируса SV40 удобным образом получают в виде фрагмента рестрикции SV40, который также содержит точку начала репликации вируса SV40. Немедленно-ранний промотор цитомегаловируса человека удобным образом получают в виде рестрикционного фрагмента HindIII E. Система для экспрессии ДНК у млекопитающих-хозяев с использованием вируса папилломы крупного рогатого скота в качестве вектора описана в патенте США № 4,419,446. Модификация этой системы описана в патенте США № 4,601,978. См. также Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982), где описана экспрессия кДНК  $\beta$ -интерферона человека в клетках мыши под контролем промотора тимидинкиназы из вируса простого герпеса. Альтернативно, в качестве промотора можно использовать длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

#### е) Компонент энхансерного элемента

Транскрипция ДНК, кодирующей антитело по настоящему описанию, высшими эукариотами часто увеличивается путем вставки энхансерной последовательности в вектор. В настоящее время известно множество энхансерных последовательностей генов млекопитающих (глобин, эластаза, альбумин,  $\alpha$ -фетопротеин и инсулин). Однако обычно используют энхансер из вируса эукариотической клетки. Примеры включают энхансер SV40 на поздней стороне точки начала репликации (100-270 п.о.), энхансер раннего промотора цитомегаловируса человека, энхансер раннего промотора цитомегаловируса мыши, энхансер полиомы на поздней стороне точки начала репликации и энхансеры аденовируса. См. также Yaniv, Nature 297:17-18 (1982), где описаны энхансерные элементы для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть сплайсирован в вектор в положении 5' или 3' по отношению к последовательности, кодирующей полипептид антитела, но обычно он расположен в сайте 5' от промотора.

#### ф) Компонент терминации транскрипции

Векторы экспрессии, используемые в эукариотических клетках-хозяевах, могут также содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно доступны из 5'- и иногда 3'-нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибированные как полиаденилированные фрагменты в нетранслируемой части мРНК, кодирующей антитело. Одним из полезных компонентов терминации транскрипции является область полиаденилирования бычьего гормона роста. См. WO94/11026 и описанный там вектор экспрессии.

#### г) Селекция и трансформация клеток-хозяев

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторах в настоящем документе включают клетки высших эукариотов, описанные в настоящем документе, включая клетки-хозяева позвоночных. Размножение клеток позвоночных в культуре (культуре ткани) стало рутинной процедурой. Примерами полезных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почек обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия почек эмбриона человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клетки почек детеныша хомячка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичника китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); 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 почек собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени серой 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); клетки TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; клетки CHOК1, клетки CHOК1SV или производные и линия гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформируют вышеописанными векторами экспрессии или клонирования для продуцирования антител и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индукции промоторов, селектирования трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

#### h) Культивирование клеток-хозяев

Клетки-хозяева, используемые для продуцирования антитела по настоящему описанию, могут быть культивированы в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как Ham's F10 (Sigma), минимальная питательная среда ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная по Дульбекко среда Игла ((DMEM), Sigma) подходят для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, любую из сред, описанных в Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), патентах США №№ 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; или 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; или патента США 30,985 можно использовать в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любая из этих сред может быть при необходимости дополнена гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид и фосфат натрия, кальция, магния), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как лекарственное средство GENTAMYCIN™), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые известны специалистам в данной области техники. Условия

культивирования, такие как температура, pH и подобные, являются теми, которые ранее использовались с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии, и будут очевидны для обычного специалиста в данной области техники.

i) Очистка антитела

При использовании рекомбинантных методов, антитело может быть продуцировано внутриклеточно или непосредственно секретировано в среду. Если антитело продуцируется внутриклеточно, в качестве первой стадии, дисперсный дебрис, либо клеток-хозяев, либо лизированных фрагментов, могут быть удалены, например, центрифугированием или ультрафильтрацией. Когда антитело секретируют в среду, супернатанты из таких систем экспрессии могут быть сначала концентрированы с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрации белка, например, устройства ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеазы, такой как PMSF, может быть включен на любой из вышеупомянутых стадий для ингибирования протеолиза, и антибиотики могут быть включены для предотвращения роста случайных загрязняющих веществ.

Композиция антител, полученная из клеток, может быть очищена с применением, например, хроматографии на гидроксилapatите, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем аффинная хроматография является удобным методом. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изоформа любого Fc домена иммуноглобулина, присутствующего в антителе. Белок А может применяться для очистки антител, которые основаны на тяжелых цепях  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  или  $\gamma 4$  человека (Lindmark et al., *J. Immunol. Methods* 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендован для всех изоформ мыши и для  $\gamma 3$  человека (Guss et al., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). Матрица, к которой присоединен аффинный лиганд, может быть агарозой, но доступны и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемыми порами или поли(стиролдивинил)бензол, обеспечивают более высокие скорости потока и более короткое время обработки, чем могут быть достигнуты с агарозой. Если антитело содержит CH3 домен, для очистки можно использовать смолу Bakerbond ABX™ (JT Baker, Phillipsburg, NJ). Другие методы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматография на диоксиде кремния, хроматография на гепарине SEPHAROSE™, хроматография на анионной или катионообменной смоле (такая как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония также доступны в зависимости от восстанавливаемого антитела.

После любых стадий предварительной очистки смесь, содержащая антитело, представляющее интерес, и загрязняющие вещества, может быть подвергнута дальнейшей очистке, например, с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия с низким pH с использованием буфера для элюирования при pH примерно 2,5-4,5, проводимой при низких концентрациях соли (например, примерно от 0 до 0,25 М соли).

В общем, различные методологии получения антител для использования в

исследованиях, тестировании и клиническом применении хорошо известны в данной области техники, согласуются с вышеописанными методологиями и/или считаются подходящими специалистами в данной области техники для конкретного антитела, представляющего интерес.

### **Продуцирование не фукозилированных антител**

В настоящем документе представлены способы получения антител с пониженной степенью фукозилирования. Например, способы, рассматриваемые в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, использование клеточных линий, дефицитных по фукозилированию белка (например, клеток Lec13 CHO, клеток CHO с нокаутом гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы, клеток, сверхэкспрессирующих  $\beta$ 1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III и дополнительно сверхэкспрессирующих  $\mu$ -маннозидазу II Гольджи и т.д.), и добавление аналогов фукозы в среду для культивирования клеток, используемую для продуцирования антител. См. Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); заявка на патент США № US 2003/0157108 A1, Presta, L; WO 2004/056312 A1; Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); и патент США № 8,574,907. Дополнительные методы снижения содержания фукозы в антителах включают технологию Glymaxx, описанную в публикации заявки на патент США № 2012/0214975. Дополнительные методы снижения содержания фукозы в антителах также включают добавление одного или нескольких ингибиторов гликозидазы в среду для культивирования клеток, используемую для продуцирования антител. Ингибиторы гликозидазы включают  $\alpha$ - глюкозидазу I,  $\alpha$ -глюкозидазу II и  $\alpha$ -маннозидазу I. В некоторых вариантах осуществления, ингибитором гликозидазы является ингибитор  $\alpha$ -маннозидазы I (например, кифунензин).

В настоящем документе, «фукозилирование ядра» относится к добавлению фукозы («фукозилированию») к N-ацетилглюкозамину («GlcNAc») в восстановительном конце N-связанного гликана. Также представлены антитела, продуцируемые такими способами, и их композиции.

В некоторых вариантах осуществления, снижают фукозилирование сложных цепей сахара, связанных с N-гликозидом, связанных с Fc областью (или доменом). Используемая в настоящем документе «сложная сахарная цепь, связанная с N-гликозидом» обычно связана с аспарагином 297 (в соответствии с нумерацией Kabat), хотя сложная сахарная цепь, связанная с N-гликозидом, также может быть связана с другими аспарагиновыми остатками. «Сложная сахарная цепь, связанная с N-гликозидом» исключает сахарную цепь с высоким содержанием маннозы, в которой только манноза включена на не восстанавливающем конце структуры ядра, но включает 1) комплексный тип, в котором не восстанавливающая концевая сторона структуры ядра имеет одну или несколько ветвей галактоза-N-ацетилглюкозамина (также называемого «gal-GlcNAc»), а не восстанавливающая концевая сторона Gal-GlcNAc необязательно содержит сиаловую кислоту, разделяющую N-ацетилглюкозамин пополам, или подобные; или 2) гибридный тип, в котором не восстанавливающая концевая сторона структуры ядра имеет как ветви

высокоманнозной сахарной цепи, связанной с N-гликозидом, так и сложной сахарной цепи, связанной с N-гликозидом.

В некоторых вариантах осуществления, «сложная сахарная цепь, связанная с N-гликозидом» включает сложный тип, в котором не восстанавливающая концевая сторона структуры ядра имеет ноль, одну или несколько ветвей галактоза-N-ацетилглюкозамина (также называемого как «gal-GlcNAc»), и не восстанавливающая концевая сторона Gal-GlcNAc необязательно дополнительно имеет структуру, такую как сиаловая кислота, разделяющая пополам N-ацетилглюкозамин, или подобные.

Согласно настоящим способам, как правило, только незначительное количество фукозы включено в сложные сахарные цепи, связанные с N-гликозидом. Например, в различных вариантах осуществления, менее примерно 60%, менее примерно 50%, менее примерно 40%, менее примерно 30%, менее примерно 20%, менее примерно 15%, менее примерно 10%, менее чем примерно 5% или менее чем примерно 1% антитела имеет фукозилирование ядра фукозой в композиции. В некоторых вариантах осуществления, по существу ни одно (т.е. менее примерно 0,5%) антитела не имеет фукозилирования ядра фукозой в композиции. В некоторых вариантах осуществления, более примерно 40%, более примерно 50%, более примерно 60%, более примерно 70%, более примерно 80%, более примерно 90%, более примерно 91%, более примерно 92%, более чем примерно 93%, более чем примерно 94%, более чем примерно 95%, более чем примерно 96%, более чем примерно 97%, более чем примерно 98% или более чем примерно 99% антитела не фукозилировано в композиции.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлено антитело, в котором по существу ни одна (т.е. менее примерно 0,5%) углеводных цепей, связанных с N-гликозидом, не содержит фукозного остатка. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлено антитело, в котором, по меньшей мере, одна или две тяжелые цепи антитела не фукозилированы.

Как описано выше, для экспрессии антитела могут быть использованы различные системы вектора экспрессии млекопитающего-хозяина. В некоторых вариантах осуществления, в питательную среду не добавлена фукоза. В некоторых вариантах осуществления, в культуральную среду добавляют эффективное количество аналога фукозы. В этом контексте «эффективное количество» относится к количеству аналога, которое достаточно для снижения включения фукозы в сложную сахарную цепь антитела, связанную с N-гликозидом, по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 20%, при по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 40% или по меньшей мере примерно 50%. В некоторых вариантах осуществления, антитела, продуцируемые настоящими способами, содержат, по меньшей мере, примерно 10%, по меньшей мере, примерно 20%, по меньшей мере, примерно 30%, по меньшей мере, примерно 40% или по меньшей мере, примерно 50% некорового фукозилированного белка (например, без фукозилирования ядра) по сравнению с антителами, продуцируемыми из клеток-хозяев, культивируемых в отсутствие аналога фукозы.

Содержание (например, соотношение) сахарных цепей, в которых фукоза не связана с N-ацетилглюкозамином на восстанавливающем конце сахарной цепи, по сравнению с сахарными цепями, в которых фукоза связана с N-ацетилглюкозамином на восстанавливающем конце сахарной цепи, может быть определено, например, как описано в примерах. Другие способы включают гидразинолиз или ферментное переваривание (см., например, *Biochemical Experimentation Methods 23: Method for Studying Glycoprotein Sugar Chain* (Japan Scientific Societies Press), edited by Reiko Takahashi (1989)), флуоресцентное мечение или радиоизотопное мечение высвобожденной сахарной цепи с последующим отделением меченой сахарной цепи хроматографией. Также, композиции высвобожденных сахарных цепей могут быть определены анализом цепей способом НРАЕС-PAD (см., например, *J. Liq Chromatogr.* 6:1557 (1983)). (См. в целом публикацию заявки на патент США № 2004/0110282).

### **III. Композиции**

В некоторых аспектах, в настоящем документе также представлены композиции (например, фармацевтические композиции), содержащие любое из анти-Siglec-8 антител, описанных в настоящем документе (например, антитело, которое связывается с Siglec-8). В некоторых аспектах, в настоящем документе представлена композиция, содержащая описанное в настоящем документе анти-Siglec-8 антитело, где указанное антитело содержит Fc область и углеводные цепи, связанные с N-гликозидом, связанные с Fc областью, где менее примерно 50% углеводных цепей, связанных с N-гликозидом, содержат фукозный остаток. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит Fc область и углеводные цепи, связанные с N-гликозидом, связанные с Fc областью, где менее примерно 45%, примерно 40%, примерно 35%, примерно 30%, примерно 25%, примерно 20% или примерно 15% углеводных цепей, связанных с N-гликозидом, содержат фукозный остаток. В некоторых аспектах, в настоящем документе представлена композиция, содержащая описанное в настоящем документе анти-Siglec-8 антитело, где указанное антитело содержит Fc область и углеводные цепи, связанные с N-гликозидом, связанные с Fc областью, причем по существу ни одна из углеводных цепей, связанных с N-гликозидом, не содержит фукозный остаток.

Терапевтические составы готовят для хранения путем смешивания активного ингредиента, имеющего желаемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами (Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Pub., Gennaro Ed., Philadelphia, Pa. 2000). Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту, метионин, витамин E, метабисульфит натрия; консерванты, изотонирующие добавки, стабилизаторы, комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); хелатирующие агенты, такие как EDTA и/или неионные поверхностно-активные вещества.

Буферы могут применяться для регулирования pH в диапазоне, который

оптимизирует терапевтическую эффективность, особенно если стабильность зависит от pH. Буферы могут присутствовать в концентрациях от примерно 50 мМ до примерно 250 мМ. Подходящие буферные агенты для использования в настоящем описании включают как органические, так и неорганические кислоты и их соли. Например, цитрат, фосфат, сукцинат, тартрат, фумарат, глюконат, оксалат, лактат, ацетат. Дополнительно, буферы могут состоять из солей гистидина и триметиламина, таких как Tris.

Консерванты могут быть добавлены для предотвращения роста микробов, и обычно присутствуют в диапазоне от примерно 0,2% до 1,0% (масс./об.). Подходящие консерванты для использования в настоящем описании включают хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; галогениды бензалкония (например, хлорид, бромид, йодид), хлорид бензетония; тимеросал, фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол.

Агенты, регулирующие тоничность, иногда называемые «стабилизаторами», могут присутствовать для регулирования или поддержания тоничности жидкости в композиции. При использовании с большими заряженными биомолекулами, такими как белки и антитела, их часто называют «стабилизаторами», потому что они могут взаимодействовать с заряженными группами боковых цепей аминокислот, тем самым уменьшая потенциал для межмолекулярных и внутримолекулярных взаимодействий. Агенты, регулирующие тоничность, могут присутствовать в любом количестве от примерно 0,1% до примерно 25% массовых или от примерно 1 до примерно 5% массовых, принимая во внимание относительные количества других ингредиентов. В некоторых вариантах осуществления, агенты, регулирующие тоничность, включают многоатомные сахарные спирты, трехатомные или высшие сахарные спирты, такие как глицерин, эритрит, арабит, ксилит, сорбит и маннит.

Дополнительные эксципиенты включают агенты, которые могут служить одним или несколькими из следующего: (1) наполнители, (2) усилители растворимости, (3) стабилизаторы и (4) агенты, предотвращающие денатурацию или прилипание к стенке контейнера. Такие эксципиенты включают: многоатомные сахарные спирты (перечисленные выше); аминокислоты, такие как аланин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин, лизин, орнитин, лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота, треонин и т.д.; органические сахара или сахарные спирты, такие как сахароза, лактоза, лактит, трегалоза, стахиоза, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, рибит, миоинизитоза, миоинизит, галактоза, галактит, глицерин, циклиты (например, инозит), полиэтиленгликоль; серосодержащие восстанавливающие агенты, такие как мочевины, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин,  $\alpha$ -монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низкомолекулярные белки, такие как сывороточный альбумин человека, сывороточный альбумин быка, желатин или другие иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; моносахариды (например, ксилоза, манноза, фруктоза, глюкоза; дисахариды (например, лактоза, мальтоза, сахароза);

трисахариды, такие как рафиноза, и полисахариды, такие как декстрин или декстран.

Неионные поверхностно-активные вещества или детергенты (также известные как «смачивающие агенты») могут присутствовать, чтобы способствовать сольюбилизации терапевтического агента, а также для защиты терапевтического белка от агрегации, вызванной перемешиванием, что также позволяет подвергать состав воздействию поверхностного напряжения сдвига, не вызывая денатурации активного терапевтического белка или антитела. Неионные поверхностно-активные вещества присутствуют в диапазоне от примерно 0,05 мг/мл до примерно 1,0 мг/мл или от примерно 0,07 мг/мл до примерно 0,2 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления, неионные поверхностно-активные вещества присутствуют в диапазоне от примерно 0,001% до примерно 0,1% масс./об. или от примерно 0,01% до примерно 0,1% масс./об. или от примерно 0,01% до примерно 0,025% масс./об.

Подходящие неионные поверхностно-активные вещества включают полисорбаты (20, 40, 60, 65, 80 и т.д.), полиоксамеры (184, 188 и т.д.), полиолы PLURONIC®, TRITON®, моноэфиры полиоксиэтиленсорбитана (TWEEN®-20, TWEEN®-80 и т.д.), лауромакрогол 400, полиоксил 40 стеарат, полиоксиэтилен гидрогенизированное касторовое масло 10, 50 и 60, моностеарат глицерина, сложный эфир сахарозы и жирной кислоты, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу. Анионные детергенты, которые могут применяться, включают лаурилсульфат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия и диоктилсульфонат натрия. Катионные детергенты включают хлорид бензалкония или хлорид бензетония.

Чтобы составы можно было использовать для введения *in vivo*, они должны быть стерильными. Состав может быть сделан стерильным фильтрацией через стерильные фильтрующие мембраны. Терапевтические композиции в настоящем документе обычно помещают в контейнер, имеющий порт для стерильного доступа, например, пакет с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций.

Путь введения соответствует известным и принятым способам, таким как однократный или многократный болюс или инфузия в течение длительного периода времени подходящим способом, например, инъекцией или инфузией подкожным, внутривенным, внутрибрюшинным, внутримышечным, внутриартериальным, внутриочаговым или внутрисуставным путем, местным введением, ингаляцией или с помощью средств замедленного высвобождения или пролонгированного высвобождения. В некоторых вариантах осуществления, композицию или анти-Siglec-8 антитело по настоящему описанию вводят внутривенной инфузией один раз в месяц в течение 3 или нескольких месяцев. В некоторых вариантах осуществления, композицию или анти-Siglec-8 антитело по настоящему описанию вводят внутривенной инфузией один раз за цикл (*например*, в день 1) в течение 1, 2, 3, 4, 5 или 6 циклов, при этом каждый цикл составляет 1 месяц, 4 недели или 28 дней.

Состав, описанный в настоящем документе, может также содержать более одного

активного соединения, если это необходимо для конкретного показания, подлежащего лечению, предпочтительно соединения с дополнительной активностью, которые не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга. Такие активные соединения обычно присутствуют в комбинации в количествах, эффективных для предполагаемой цели.

#### **IV. Готовые изделия или наборы**

В другом аспекте представлено готовое изделие или набор, который содержит анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе (например, антитело, которое связывает Siglec-8 человека). Готовое изделие или набор могут дополнительно содержать инструкции по применению антитела в способах согласно настоящему описанию. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, готовое изделие или набор содержат инструкции по применению анти-Siglec-8 антитела, которое связывается с Siglec-8 человека, в способах лечения и/или профилактики тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного колита, тучноклеточного энтерита, тучноклеточного дуоденита и/или тучноклеточного гастроэнтерита у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества анти-Siglec-8 антитела, которое связывается с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления, готовое изделие содержит лекарственное средство, содержащее антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, и вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению лекарственного средства человеку, нуждающемуся в этом, для лечения и/или профилактики тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного колита, тучноклеточного энтерита, тучноклеточного дуоденита и/или тучноклеточного гастроэнтерита. В некоторых вариантах осуществления, вкладыш в упаковку дополнительно указывает на то, что лечение является эффективным в снижении одного или нескольких симптомов у индивидуума с тучноклеточным гастритом, тучноклеточным эзофагитом, тучноклеточным колитом, тучноклеточным энтеритом, тучноклеточным дуоденитом и/или тучноклеточным гастроэнтеритом по сравнению с исходным уровнем до приема лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума диагностирован тучноклеточный гастрит, тучноклеточный колит, тучноклеточный дуоденит, тучноклеточный энтерит или тучноклеточный гастроэнтерит до введения лекарственного средства, содержащего антитело. В некоторых вариантах осуществления, индивидуумом является человек.

Готовое изделие или набор могут дополнительно содержать контейнер. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы (например, двухкамерные флаконы), шприцы (такие как одно- или двухкамерные шприцы) и пробирки. Контейнер может быть изготовлен из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит состав.

Готовое изделие или набор могут дополнительно включать этикетку или вкладыш в упаковку, который находится на контейнере или связан с ним, который может указывать направления для восстановления и/или использования состава. Этикетка или вкладыш в

упаковку могут дополнительно указывать, что состав применяется или предназначен для подкожного, внутривенного или других способов введения для лечения и/или профилактики тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного колита, тучноклеточного энтерита, тучноклеточного дуоденита и/или тучноклеточного гастроэнтерита у индивидуума. Контейнер, содержащий состав, может быть флаконом для одноразового использования или флаконом для многократного использования, который позволяет многократно вводить восстановленный состав. Готовое изделие или набор могут дополнительно включать второй контейнер, содержащий подходящий разбавитель. Готовое изделие или набор могут дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой, терапевтической и пользовательской точек зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковки с инструкциями по применению.

В конкретном варианте осуществления, настоящее описание представляет наборы для однократного введения дозы. Такие наборы содержат контейнер с водным составом терапевтического антитела, включая как одно-, так и многокамерные предварительно заполненные шприцы. Типовые предварительно заполненные шприцы доступны от Vetter GmbH, Ravensburg, Germany.

В другом варианте осуществления, в настоящем документе представлено готовое изделие или набор, включающий составы, описанные в настоящем документе, для введения в автоматическом инъекционном устройстве. Автоматический шприц можно описать как устройство для инъекций, которое после активации доставит свое содержимое без дополнительных необходимых действий со стороны пациента или вводящего. Они особенно подходят для самолечения терапевтическими составами, когда скорость доставки должна быть постоянной, а время доставки превышает несколько секунд.

В другом аспекте представлено готовое изделие или набор, который содержит анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе (например, антитело, которое связывает Siglec-8 человека). Готовое изделие или набор могут дополнительно содержать инструкции по применению антитела в способах по настоящему описанию. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, готовое изделие или набор содержат инструкции по применению анти-Siglec-8 антитела, которое связывается с Siglec-8 человека, в способах лечения или профилактики тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного колита, тучноклеточного энтерита, тучноклеточного дуоденита и/или тучноклеточного гастроэнтерита у индивидуума, включающих введение индивидууму эффективного количества анти-Siglec-8 антитела, которое связывается с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления, готовое изделие или набор содержат лекарственное средство, содержащее антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, и вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению лекарственного средства пациенту, нуждающемуся в этом, для лечения и/или предотвращения тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного колита, тучноклеточного энтерита, тучноклеточного дуоденита и/или тучноклеточного

гастроэнтерита.

В настоящем описании также представлено готовое изделие или набор, который содержит анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе (например, антитело, которое связывает Siglec-8 человека), в комбинации с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами (например, вторым лекарственным средством) для лечения или профилактики тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного колита, тучноклеточного энтерита, тучноклеточного дуоденита и/или тучноклеточного гастроэнтерита у индивидуума. Готовое изделие или набор могут дополнительно содержать инструкции по применению антитела в комбинации с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами в способах по настоящему описанию. Например, готовое изделие или набор в настоящем документе необязательно дополнительно содержит контейнер, содержащий второе лекарственное средство, где анти-Siglec-8 антитело является первым лекарственным средством, и данное изделие или набор дополнительно содержит инструкции на этикетке или вкладыше в упаковку для лечения индивидуума вторым лекарственным средством в эффективном количестве. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, готовое изделие или набор содержат инструкции по применению анти-Siglec-8 антитела, которое связывается с Siglec-8 человека, в комбинации с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами в способах лечения или профилактики тучноклеточного гастрита, тучноклеточного эзофагита, тучноклеточного колита, тучноклеточного энтерита, тучноклеточного дуоденита и/или тучноклеточного гастроэнтерита у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления, готовое изделие или набор содержат лекарственное средство, содержащее антитело, которое связывается с Siglec-8 человека (например, первое лекарственное средство), одно или несколько дополнительных лекарственных средств и вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению первого лекарственного средства в сочетании с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами (например, вторым лекарственным средством). В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных терапевтических агентов могут включать, но не ограничиваются ими, PPI, системные кортикостероиды, местные кортикостероиды, антигистаминные препараты, стабилизаторы тучных клеток, H-2 блокаторы, анти-IgE антитела, ингибиторы кальциневрина, иммуномодулирующие агенты и иммунодепрессанты (например, азатиоприн, 6-MP, MMF и ингибиторы mTOR).

Понятно, что аспекты и варианты осуществления, описанные в настоящем документе, предназначены только для иллюстративных целей, и что различные модификации или изменения в их свете будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в сущность и объем данной заявки и объем прилагаемой формулы изобретения.

#### ПРИМЕРЫ

Настоящее раскрытие будет более полно понято со ссылкой на следующие

примеры. Однако примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего описания. Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем документе, предназначены только для иллюстративных целей, и что различные модификации или изменения в их свете будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в сущность и объем данной заявки и объем прилагаемой формулы изобретения.

**Пример 1: Структура фазы 1b, открытого, с увеличением дозы, исследования для подтверждения концепции для оценки безопасности, переносимости и клинической пользы лечения анти-Siglec-8 антителом у пациентов с тучноклеточным гастритом и/или гастроэнтеритом**

В продолжающемся исследовании по оценке эффективности и безопасности анти-Siglec-8 антитела для лечения пациентов с эозинофильным гастритом и/или гастроэнтеритом была найдена субпопуляция пациентов, которые, несмотря на соответствующие критериям симптомов боли в животе, тошноты и/или диареи, не имеют необходимого количества эозинофилов в слизистой оболочке желудка и/или двенадцатиперстной кишки. Вместо этого, было обнаружено, что эти пациенты имеют значительное количество тучных клеток (в большинстве случаев более 30 тучных клеток/поле зрения (HPF)) в слизистой оболочке желудка и/или двенадцатиперстной кишки. Согласно измерениям, нормальные уровни составляют примерно менее 20 тучных клеток/HPF (Doyle et al., *Am. J. Surg. Pathol.* (2014) 38:832-843; Jakate et al., *Arch. Pathol. Lab. Med.* (2006) 130:362-367; Tison et al., *Allergy Clin. Immunol.* (2010) Abstract 714), подразумевая, что повышенные тучные клетки у этих пациентов могут быть ответственны за желудочно-кишечную симптоматику. Поскольку пациенты соответствовали тем же критериям симптомов, что и пациенты в исследовании анти-Siglec-8 антител, и они потерпели неудачу или не находились под адекватным контролем при лечении класса систем органов (SOC), у них есть существенная потребность в улучшении лечения.

Снижение количества или активации тучных клеток ткани может быть полезным при лечении пациентов с умеренными и тяжелыми желудочно-кишечными симптомами и повышенным количеством тучных клеток в желудке и/или двенадцатиперстной кишке, то есть состоянием, называемым тучноклеточным гастритом и/или гастроэнтеритом в этом исследовании.

Так как тучноклеточный гастрит и гастроэнтерит являются относительно слабо описанными заболеваниями, для них не имеется одобренных Food and Drug Administration (FDA) способов лечения. Современные способы лечения и лечение этих пациентов включают множество различных подходов, включая ингибиторы протонной помпы (PPI), ограниченную/элементарную диету, системные или пероральные кортикостероиды и периодическое использование иммуномодулирующих биопрепаратов не по назначению.

Исследование, описанное в настоящем примере, разработано, чтобы проверить безопасность и эффективность лечения анти-Siglec-8 антителом у больных с тучноклеточным гастритом и/или гастроэнтеритом.

### **Выбор дозы**

В этом исследовании, пациентов с тучноклеточным гастритом и/или гастроэнтеритом лечат вплоть до шести дозами анти-Siglec-8 НЕКА (не фукозилированного IgG1) антитела (также называемого «исследуемое лекарственное средство»), вводимыми каждые 4 недели. Дозы составляют 0,3 мг/кг для первой инфузии, 1 мг/кг для второй инфузии, и 3 мг/кг для 4 и последующих инфузий.

### **Отбор пациентов**

Популяцией для этого исследования являются взрослые пациенты мужского и женского пола с тучноклеточным гастритом и/или гастроэнтеритом в возрасте от 18 до 80 лет.

Критерии включения пациентов включают:

1) Пациенты мужского или женского пола в возрасте от 18 до 80 лет на момент подписания формы информированного согласия (ICF).

2) Не прошли скрининг в предыдущем исследовании анти-Siglec-8 антитела из-за несоответствия критерию приемлемости эозинофилии слизистой оболочки желудка (определяемой как больше или равно 30 эозинофилов/HPF в 5 HPF) или слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки (определяемой как больше или равно 30 эозинофилов/HPF в 3 HPF) при эзофагогастродуоденоскопии (EGD), выполненной во время скрининга для исследования анти-Siglec-8 антитела.

3) Средняя недельная оценка больше или равна 3 (по шкале от 0 до 10), зарегистрированная для боли в животе, диареи или тошноты в опроснике результатов, сообщаемых пациентом (PRO), в течение как минимум 2 недель из 3 недель сбора PRO. Минимум 4 опросников были завершены на каждой отборочной неделе.

4) Имеют более или равно 30 тучных клеток/HPF, по меньшей мере, в 3 HPF в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки и/или желудка при EGD, выполненной в течение предыдущего периода скрининга исследования анти-Siglec-8 антитела.

5) Субъекты не достигли успеха или не получили адекватный контроль при лечении по стандартам лечения симптомов EG или EGE (которые могут включать PPI, системные или местные кортикостероиды и/или диеты, среди прочих).

6) Если при других видах лечения EG, EGE или EoE при включении в исследование, пациенты получали стабильную дозу в течение, по меньшей мере, 5 периодов полувыведения до скрининга и были готовы продолжать прием этой дозы в течение всего исследования.

7) Если пациенты придерживались ранее существовавших диетических ограничений, они были бы готовы сохранять эти диетические ограничения на протяжении всего исследования, насколько это возможно.

8) Способны и желают соблюдать все процедуры исследования.

Критерии исключения пациентов включают:

1) Известную гиперчувствительность к любому из компонентов исследуемого лекарственного средства.

2) Наличие аномальных лабораторных показателей, которые Исследователь считает клинически значимыми.

3) Любое заболевание, состояние (медицинское или хирургическое) или сердечная аномалия, которые, по мнению Исследователя, могут подвергнуть субъекта повышенному риску.

4) Известный анамнез злоупотребления или зависимости от алкоголя, наркотиков или других веществ.

5) Участие в параллельном интервенционном исследовании с последним вмешательством, проводимым в течение 30 дней до введения исследуемого препарата (или 90 дней или 5 периодов полувыведения, в зависимости от того, что было дольше, для биологических продуктов).

6) Женщины, которые беременны, кормят грудью или планируют забеременеть во время участия в исследовании.

#### **Дизайн исследования**

Это исследование представляет собой Фазы 1b многоцентровое открытое исследование для оценки безопасности, переносимости и клинической пользы анти-Siglec-8 антитела, вводимого в виде ежемесячных инфузий вплоть до 6 доз пациентам с тучноклеточным гастритом и/или гастроэнтеритом. Это исследование включает пациентов, которые были отобраны и отвечают всем критериям отбора пациентов для предыдущих исследований анти-Siglec-8 антитела, за исключением критерия наличия больше или равно 30 эозинофилов/HPF в 5 HPF в слизистой оболочке желудка или больше или равно 30 эозинофилов/HPF в 3 HPF слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки. Для того, чтобы соответствовать критериям включения в это исследование, пациенты имеют больше или равно 30 тучных клеток/HPF, в по меньшей мере, 3 HPF в слизистой оболочке желудка и/или двенадцатиперстной кишки. Пациентам позволяют участвовать в этом исследовании после того, как они потерпели неудачу при отборе для предыдущего исследования анти-Siglec-8 антитела.

Исследование имеет следующий дизайн:

1) 45-дневный период отбора с исходной оценкой соответствия критериям. Исходные оценки из предыдущего исследования анти-Siglec-8 антитела могут применяться в качестве исходных оценок для этого исследования, если собраны в течение 45 дней после начала включения в исследование. Скрининг результатов биопсии при эзофагогастродуоденоскопии (EGD) из предыдущего исследования анти-Siglec-8 антитела может быть использован, если симптомы сохраняются (как указано в Критерии включения № 3).

2) Если пациенты не прошли отбор для предыдущего исследования анти-Siglec-8 антитела из-за того, что они не имеют больше или равно 30 эозинофилов/HPF в слизистой оболочке желудка или двенадцатиперстной кишки, но имеют больше или равно 30 тучных клетки/HPF в, по меньшей мере, 3 HPF в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки и/или желудка, они получают 6 доз анти-Siglec-8 антитела внутривенной инфузией в дни

1, 29 ( $\pm 3$  дня), 57 ( $\pm 3$  дня), 85 ( $\pm 3$  дня), 113 ( $\pm 3$  дня) и 141 ( $\pm 3$  дня) в этом исследовании.

3) Повторение ЭГД с биопсией проводят в день 155 ( $\pm 3$  дня) или приблизительно через 2 недели после последней дозы исследуемого препарата, если пациент был остановлен досрочно.

4) Лекарства, принимаемые до исследования, и ранее существовавшие ограничения в диете остаются неизменными на протяжении всего исследования. Пациенты проходят стандартизированную исходную оценку привычек питания, пищевых привычек/ограничений и поведения, связанного с отказом от пищи, и их просят поддерживать аналогичные привычки и ограничения на протяжении всего исследования.

### **Основная цель**

Основной целью этого исследования является оценка безопасности и переносимости анти-Siglec-8 антитела у пациентов с тучноклеточным гастритом и/или гастроэнтеритом.

### **Вторичные цели**

Вторичные цели данного исследования включают оценку эффектов анти-Siglec-8 антитела у больных с тучноклеточным гастритом и/или гастроэнтеритом для следующих параметров:

1) изменение числа тучных клеток/HPF в биопсии желудка и двенадцатиперстной кишки.

2) Изменение оценки желудочно-кишечных симптомов, оцениваемое с помощью ежедневного опросника результатов, сообщаемых пациентом (PRO).

3) Изменение абсолютного количества эозинофилов в периферической крови.

### **Показатели фармакодинамических результатов**

Кровь (сыворотку) собирают для оценки концентраций анти-Siglec-8 антитела с использованием проверенного иммуноферментного анализа (ELISA).

### **Показатели эффективности**

Оценивают количество тучных клеток в слизистой оболочке желудка и двенадцатиперстной кишки. Кроме того, количество эозинофилов и тучных клеток в слизистой оболочке пищевода оценивают у пациентов с сопутствующим эозинофильным эзофагитом.

Другие критерии оценки эффективности в этом исследовании включают:

1) Долю изменения от исходного уровня количества тучных клеток/HPF в слизистой оболочке желудка и/или двенадцатиперстной кишки у пациентов с тучноклеточным гастритом и/или гастроэнтеритом.

2) Изменение по сравнению с исходным уровнем средних еженедельных показателей желудочно-кишечной симптоматики, измеренных с помощью опросника PRO (общая оценка и ежедневные оценки по пунктам, включая следующие симптомы: интенсивность боли в животе, интенсивность тошноты, интенсивность рвоты, частота диареи, интенсивность спазмов в животе, интенсивность вздутия живота, интенсивность раннего насыщения и потеря аппетита).

3) Доля пациентов с гистологическим ответом, определяемым как менее 30 тучных клеток/HPF в слизистой оболочке желудка и/или двенадцатиперстной кишки у пациентов с тучноклеточным гастритом и/или гастроэнтеритом.

4) Изменение абсолютного количества эозинофилов в периферической крови по сравнению с исходным уровнем.

5) Изменение по сравнению с исходным уровнем количества эозинофилов и тучных клеток/HPF в биопсиях пищевода у пациентов с сопутствующим эозинофильным эзофагитом.

6) Морфологическая оценка биопсий желудка и двенадцатиперстной кишки до и после лечения.

7) Доля изменения массы тела от исходного уровня.

8) Изменение по сравнению с исходным уровнем в обследовании функционального здоровья и благополучия по данным пациентов SF-36.

### **Исследуемое лекарственное средство, доза и введение**

Все пациенты получают 6 внутривенных инфузий анти-Siglec-8 антитела во время исследования, вводимых в виде однократной периферической внутривенной инфузии с использованием инфузионного насоса, как указано в Фармацевтическом руководстве исследования. Точную дозу рассчитывают до каждой инфузии и на основе массы тела пациента в данный момент. Анти-Siglec-8 антитело в дозе 0,3 мг/кг готовят в соответствии с массой тела пациента и вводят в день 1. Анти-Siglec-8 антитело в дозе 1 мг/кг готовят в соответствии с массой тела пациента и вводят в день 29 ( $\pm 3$  дня). Последующие инфузии в дозе 3 мг/кг готовят в соответствии с массой тела пациента и вводят в день 57 ( $\pm 3$  дня), день 85 ( $\pm 3$  дня), день 113 ( $\pm 3$  дня) и день 141 ( $\pm 3$  дня).

Безопасность и переносимость оценивают на протяжении всего исследования через мониторинг и оценку нежелательных явлений (АЕ), тяжесть которых оценивают по критериям NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). Всем АЕ присваивают степень тяжести, и их оценивают, чтобы определить, являются ли они клинически значимыми и связаны ли с исследуемым препаратом.

**Пример 2: Симптоматические пациенты с подозрением на эозинофильный гастрит и/или энтерит, имеющие повышенное количество тучных клеток в слизистой оболочке без эозинофилии.**

Патологическое накопление и чрезмерная активация эозинофилов вовлечены во множественные хронические воспалительные заболевания желудочно-кишечного тракта (**фиг. 1**), включая эозинофильный эзофагит (ЕоЕ), гастрит (EG), энтерит (EEn) и колит (совместно именуемые эозинофильные желудочно-кишечные заболевания, EGID). Пациенты с EGID имеют пониженное качество жизни из-за таких изнуряющих симптомов, как дисфагия/затрудненное глотание, боли в животе, тошнота, рвота и диарея.

Хотя исторически считалось, что патогенез EGID управляется эозинофилами, было также показано, что тучные клетки имеют повышенный уровень при ЕоЕ (Caldwell et al. (2014) J. Allergy Clin. Immunol. 134:1114-1124; Youngblood et al. (2019) JCI Insight 4(19)).

Однако роль тучных клеток в EGID, особенно, отличных от EoE, еще предстоит установить. EG и EEp поражают 45000-50000 пациентов в США, хотя это число может быть значительно занижено. Текущие варианты лечения, такие как ограничение питания и кортикостероиды, имеют ограниченную эффективность и/или не подходят для постоянного применения. Таким образом, остается значительная неудовлетворенная потребность в новых таргетных терапиях.

Как отмечено в Примере 1, во время включения в продолжающееся исследование для оценки эффективности и безопасности анти-Siglec-8 антитела для лечения пациентов с эозинофильным гастритом и/или гастроэнтеритом, была выявлена субпопуляция пациентов, которые не имеют необходимое количество эозинофилов в слизистой оболочке желудка и/или двенадцатиперстной кишки, но вместо этого имеют значительное количество тучных клеток (в большинстве случаев более 30 тучных клеток/поле зрения (HPF)) в слизистой оболочке желудка и/или двенадцатиперстной кишки). Этот пример характеризует таких симптоматических пациентов с подозрением на EG/EEp, которые не соответствовали гистопатологическим критериям входа для эозинофилии слизистой оболочки для фазы 2 исследования анти-Siglec-8 антитела у пациентов с EG/EEp.

#### *Протокол скрининга*

Пациентов с предшествующим диагнозом или подозрением на EG/EEp включают в скрининг. Субъекты со средней недельной оценкой  $\geq 3$  интенсивности (шкала 0-10) в отношении боли в животе, диареи и/или тошноты в течение  $\geq 2$  недель по опроснику результатов лечения, сообщаемых пациентом (PRO), квалифицированы для проведения эндоскопии верхних отделов (EGD) с биопсией.

Множественные биопсии берут у каждого симптоматического субъекта в соответствии со стандартизованным протоколом: 8-10 биопсий желудка, 4-6 биопсий двенадцатиперстной кишки и 4-6 биопсий пищевода (только если у субъекта в анамнезе был EoE или если наблюдались признаки EoE во время ЭГД). Критерии включения:  $\geq 30$  эозинофилов (eos)/поле зрения (hpf; площадь  $0,237 \text{ мм}^2$ ) в 5 hpf (желудок) и/или  $\geq 30$  eos/hpf в 3 hpf (двенадцатиперстная кишка); и никаких других известных причин для ЖК симптомов или тканевой эозинофилии.

Ежедневный опросник PRO фиксирует 8 симптомов: боль в животе, тошноту, диарею, рвоту, преждевременное насыщение, потерю аппетита, спазмы в животе и вздутие живота.

#### *Полученные результаты*

Распределение пациентов показано на **фиг. 2А**. 113 пациентов прошли скрининг, у 88 были обнаружены симптомы заболевания. Из этих 88, при скрининге, как описано выше, у 71 (81%) было обнаружено  $\geq 30$  eos и  $\geq 30$  тучных клеток, у 16 (18%) было обнаружено только  $\geq 30$  тучных клеток, и только у 1 (1%) было обнаружено только  $\geq 30$  eos. Таким образом, 87 из 88 симптоматических пациентов имели повышенное количество тучных клеток. На **фиг. 2В** сравнивают исходные характеристики пациентов с  $\geq 30$  eos (всего 72) с пациентами, имеющими  $\geq 30$  тучных клеток, но  $< 30$  eos (всего 16).

Количество эозинофилов и тучных клеток в биопсиях либо желудка (**фиг. 3А**), либо двенадцатиперстной кишки (**фиг. 3В**) показаны на **фиг. 3А** и **3В**. В биопсии желудка (**фиг. 3А**) у пациентов с  $\geq 30$  eos/hpf в 5 hpf среднее пиковое количество клеток (на 5 hpf) составляло 89 эозинофилов и 64 тучные клетки, тогда как пациенты с  $\geq 30$  тучными клетками/hpf в 5 hpf но  $< 30$  eos/hpf в 5 hpf имели среднее пиковое количество клеток (на 5 hpf), равное 7 эозинофилам и 52 тучным клеткам. В биопсии двенадцатиперстной кишки (**фиг. 3В**) у пациентов с  $\geq 30$  eos/hpf в 3 hpf среднее пиковое количество клеток (на 3 hpf) составляло 65 эозинофилов и 56 тучных клеток, тогда как пациенты с  $\geq 30$  тучными клетками/hpf в 3 hpf, но  $< 30$  eos/hpf в 3 hpf имели среднее пиковое количество клеток (на 3 hpf) 15 эозинофилов и 51 тучная клетка. На **фиг. 4** показана средняя оценка интенсивности симптома для обеих групп пациентов в отношении раннего насыщения, вздутия живота, боли в животе, потери аппетита, спазмов в животе, тошноты, диареи и рвоты (сверху вниз). Аналогичные профили симптомов наблюдались между двумя группами (*т. е.* у пациентов, чьи биопсии показали  $\geq 30$  eos/hpf, по сравнению с пациентами, чьи биопсии показали  $< 30$  eos/hpf, но  $\geq 30$  тучных клеток/hpf).

Два отдельных исследования клинических случаев показаны на **фиг. 5А** и **5В**. Пациенту в исследовании клинического случая А (**фиг. 5А**) был поставлен диагноз EG, подтвержденный биопсией, в 2015 году. Этот пациент не принимал местные или системные стероиды до скрининговой биопсии. Пациент в исследовании клинического случая В (**фиг. 5В**) не имел предыдущего диагноза EGID. Эти симптомы соответствуют EG и/или EEn, несмотря на низкий уровень эозинофилов при скрининге.

Кроме того, анализ ткани биопсии желудка человека показал, что повышенная активация тучных клеток наблюдалась в тканях, где было обнаружено повышение только тучных клеток (а не эозинофилов). Ткань биопсии желудка человека обрабатывают до отдельных клеток, и тучные клетки (CD117+ Siglec-8+ клетки) и эозинофилы (CD117-Siglec-8+ клетки) выделяют с помощью проточной цитометрии (**фиг. 6А**). Из них тучные клетки дополнительно анализируют на маркер активации и дегрануляции тучных клеток CD63 с использованием проточной цитометрии (**фиг. 6В**). Чтобы определить, были ли активированы тучные клетки, клетки окрашивают анти-CD63 или антителом отрицательного контроля. Эти результаты демонстрируют активацию тучных клеток в этих тканях.

Также были проанализированы данные результатов опросника PRO, описанного выше. На **фиг. 7** показано среднее и медианное изменение общей оценки симптомов от исходного уровня (среднесуточное значение периода скрининга) до среднесуточной оценки в течение двух недель после последней дозы анти-Siglec-8 антитела. Результаты демонстрируют снижение общего количества симптомов в среднем на 64% и на 69% после последней дозы анти-Siglec-8 антитела по сравнению с исходным уровнем.

#### *Заключение*

88 пациентов с подозрением на EG и/или EEn и активными симптомами прошли эндоскопию и биопсию. 72/88 соответствовали гистологическим критериям эозинофилов

для исследования. 87/88 (99%) обследованных пациентов имели повышенное количество тучных клеток в биопсиях ткани желудка и/или двенадцатиперстной кишки. Профили симптомов были сходными у пациентов с тканевой эозинофилией и без нее.

Эти данные свидетельствуют о том, что тучные клетки играют важную патогенетическую роль у пациентов с подозрением на EG/EEп и повышают возможность не эозинофильного состояния, управляемого тучными клетками. Благодаря способности анти-Siglec-8 антитела ингибировать тучные клетки, пациентам с повышенным содержанием тучных клеток без тканевой эозинофилии было предложено принять участие в открытом клиническом испытании анти-Siglec-8 антитела.

#### ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

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

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

#### Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

##### МЫШИ

QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAG  
GSTNYNSALMSRLSISKDNSKSKVFLKINSLQTDALYYCARDGSSPYYYSM EYWGQ  
GTSVTVSS (SEQ ID NO:1)

#### Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

##### RHA

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWA  
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSM EYW  
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:2)

#### Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

##### RHB

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWLGVIWA  
GGSTNYNSALMSRLSISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSM EYW  
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:3)

#### Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

##### RHC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWA  
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSM EYW  
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:4)

#### Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

##### RHD

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWLSVIWA  
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSM EYW  
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:5)

#### Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHE

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWA  
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYW  
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:6)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHF

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWA  
GGSTNYNSALMSRLTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYW  
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:7)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHG

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWA  
GGSTNYNSALMSRFSISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYW  
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:8)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHA2

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISYGAHWIRQPPGKGLEWIGVIWAGG  
STNYNSALMSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQG  
TLVTVSS (SEQ ID NO:9)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHB2

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAG  
GSTNYNSALMSRLSISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQ  
GTLVTVSS (SEQ ID NO:10)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи мутанта

2E2 RHE S-G

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWA  
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYGMEYW  
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:11)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHE E-D

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWA  
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMDYW  
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:12)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHE Y-V

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWA  
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEVW  
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:13)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи

тройного мутанта 2E2 RHE

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWA  
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYGMDVW  
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:14)

Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи 2E2  
мышь

QIILTQSPAIMASAPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASG  
VPVRFSGSGSGTSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:15)

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

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

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

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

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

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

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

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

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLASG  
IPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPYTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:23)

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

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQKPGQAPRLLIYSTSNLASG  
IPARFSGSGSGTDYTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPYTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:24)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи HEKA и тяжелой цепи HEKF  
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWA  
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMYEW

GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG  
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTC  
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP  
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD  
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:75)

Аминокислотная последовательность легкой цепи HEKA

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASG  
IPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST  
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:76)

Аминокислотная последовательность легкой цепи HEKF

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASG  
IPARFSGSGSGTDYTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIKRTVAAPSVFIFPP  
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSST  
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:77)

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPCPAP  
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:78)

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG4

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHDHPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFL  
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDGSFFLYSRLTV  
DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:79)

Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи Ig каппа

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID  
NO:80)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 2C4 и 2E2 IgG1 мышцы

QVQLKRRASGPGLVAPSQSLTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWA  
GGSTNYNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKINSLQTDALYYCARDGSSPYYYSMYEWG  
QGTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGV  
HTFPAVLESDLYTLSSSVTVPSRPRSETVTCNVVHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTV  
PEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREE

QFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPK  
EQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVNQ  
KSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNNHTEKSLSHSPG (SEQ ID NO:81)

Аминокислотная последовательность легкой цепи 2C4 каппа мыши

EIILTQSPAIMASAPGEEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASG  
VPVRFSGSGSGTSSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKADAAPTVSIFP  
PSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSST  
LTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE (SEQ ID NO:82)

Аминокислотная последовательность легкой цепи 2E2 каппа мыши

QIILTQSPAIMASAPGEEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASG  
VPVRFSGSGSGTSSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKADAAPTVSIFP  
PSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSST  
LTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE (SEQ ID NO:83)

Аминокислотная последовательность химерной тяжелой цепи 2C4 и 2E2 IgG1

QVQLKRASGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWA  
GGSTNYNSALMSRLSISKDNSKSKVFLKINSLQTDALYYCARDGSSPYYSMEYWG  
QGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV  
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCF  
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN  
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR  
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS  
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:84)

Аминокислотная последовательность легкой цепи химерного 2C4 каппа

EIILTQSPAIMASAPGEEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASG  
VPVRFSGSGSGTSSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIF  
PPSDEQLKSGTASVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSLSS  
TLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:85)

Аминокислотная последовательность легкой цепи химерного 2E2 каппа

QIILTQSPAIMASAPGEEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASG  
VPVRFSGSGSGTSSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIF  
PPSDEQLKSGTASVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYSLSS  
TLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:86)

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVGIWA  
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYSMEYWG  
GQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV  
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP  
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV

YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS  
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO:87)

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи 1C3  
мышцы (подчеркнутые остатки включают CDR H1 и H2 согласно нумерации Chothia)

EVQVVESGGDLVKS<sup>GG</sup>SLKLS<sup>CAAS</sup>G<sup>FPFSS</sup>Y<sup>AMS</sup>W<sup>RQTP</sup>DK<sup>RLE</sup>W<sup>VAII</sup>SS<sup>G</sup>  
G<sup>SY</sup>T<sup>YY</sup>S<sup>DS</sup>V<sup>KGR</sup>F<sup>TISR</sup>D<sup>NAK</sup>N<sup>TLYL</sup>Q<sup>MSS</sup>L<sup>KSE</sup>D<sup>TAM</sup>Y<sup>Y</sup>C<sup>AR</sup>H<sup>ETA</sup>Q<sup>AA</sup>W<sup>FAY</sup>W<sup>G</sup>  
Q<sup>G</sup>T<sup>L</sup>V<sup>T</sup>V<sup>S</sup>A (SEQ ID NO:106)

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи 1H10  
мышцы (подчеркнутые остатки включают CDR H1 и H2 согласно нумерации Chothia)

EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTAS<sup>GFNIK</sup>D<sup>YY</sup>M<sup>YW</sup>V<sup>KQR</sup>PE<sup>Q</sup>GLE<sup>W</sup>I<sup>G</sup>R<sup>I</sup>A<sup>PE</sup>  
D<sup>G</sup>D<sup>T</sup>E<sup>Y</sup>A<sup>PK</sup>F<sup>Q</sup>G<sup>KAT</sup>V<sup>TAD</sup>T<sup>SS</sup>N<sup>TAY</sup>L<sup>H</sup>L<sup>SSL</sup>T<sup>SE</sup>D<sup>TAV</sup>Y<sup>Y</sup>C<sup>T</sup>T<sup>E</sup>G<sup>N</sup>Y<sup>Y</sup>G<sup>SS</sup>I<sup>L</sup>D<sup>Y</sup>W<sup>G</sup>  
Q<sup>G</sup>T<sup>T</sup>L<sup>T</sup>V<sup>S</sup>S (SEQ ID NO:107)

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи 4F11  
мышцы (подчеркнутые остатки включают CDR H1 и H2 согласно нумерации Chothia)

QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKAS<sup>G</sup>Y<sup>A</sup>F<sup>R</sup>SS<sup>W</sup>M<sup>N</sup>W<sup>V</sup>K<sup>Q</sup>R<sup>P</sup>G<sup>K</sup>G<sup>L</sup>E<sup>W</sup>I<sup>G</sup>Q<sup>I</sup>Y<sup>P</sup>  
G<sup>DD</sup>Y<sup>T</sup>N<sup>Y</sup>N<sup>G</sup>K<sup>F</sup>K<sup>G</sup>V<sup>T</sup>L<sup>T</sup>A<sup>D</sup>R<sup>SS</sup>S<sup>T</sup>A<sup>Y</sup>M<sup>Q</sup>L<sup>SS</sup>L<sup>T</sup>S<sup>E</sup>D<sup>S</sup>A<sup>V</sup>Y<sup>F</sup>C<sup>A</sup>R<sup>L</sup>G<sup>P</sup>Y<sup>G</sup>P<sup>F</sup>A<sup>D</sup>W<sup>G</sup>Q  
G<sup>T</sup>L<sup>V</sup>T<sup>V</sup>S<sup>A</sup> (SEQ ID NO:108)

Аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи 1C3  
мышцы

QIVLTQSPA<sup>I</sup>M<sup>S</sup>A<sup>S</sup>P<sup>G</sup>E<sup>K</sup>V<sup>T</sup>M<sup>T</sup>C<sup>S</sup>A<sup>S</sup>S<sup>S</sup>V<sup>S</sup>Y<sup>M</sup>H<sup>W</sup>Y<sup>Q</sup>Q<sup>K</sup>S<sup>G</sup>T<sup>S</sup>P<sup>K</sup>R<sup>W</sup>I<sup>Y</sup>D<sup>T</sup>S<sup>K</sup>L<sup>A</sup>  
Y<sup>G</sup>V<sup>P</sup>A<sup>R</sup>F<sup>S</sup>G<sup>S</sup>G<sup>S</sup>G<sup>T</sup>S<sup>Y</sup>L<sup>T</sup>I<sup>S</sup>S<sup>M</sup>E<sup>A</sup>E<sup>D</sup>A<sup>A</sup>T<sup>Y</sup>Y<sup>C</sup>Q<sup>Q</sup>W<sup>S</sup>S<sup>N</sup>P<sup>P</sup>T<sup>F</sup>G<sup>G</sup>G<sup>T</sup>K<sup>L</sup>E<sup>I</sup>K (SEQ ID  
NO:109)

Аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи 1H10  
мышцы

DIQMTQT<sup>T</sup>S<sup>S</sup>L<sup>S</sup>A<sup>S</sup>L<sup>G</sup>D<sup>R</sup>V<sup>T</sup>I<sup>S</sup>C<sup>R</sup>A<sup>S</sup>Q<sup>D</sup>I<sup>T</sup>N<sup>Y</sup>L<sup>N</sup>W<sup>Y</sup>Q<sup>Q</sup>K<sup>P</sup>D<sup>G</sup>T<sup>V</sup>K<sup>L</sup>L<sup>I</sup>Y<sup>F</sup>T<sup>S</sup>R<sup>L</sup>H<sup>S</sup>  
G<sup>V</sup>P<sup>S</sup>R<sup>F</sup>S<sup>G</sup>S<sup>G</sup>S<sup>G</sup>T<sup>D</sup>Y<sup>S</sup>L<sup>T</sup>I<sup>S</sup>N<sup>L</sup>E<sup>Q</sup>E<sup>D</sup>I<sup>A</sup>T<sup>Y</sup>F<sup>C</sup>Q<sup>Q</sup>G<sup>N</sup>T<sup>L</sup>P<sup>W</sup>T<sup>F</sup>G<sup>G</sup>G<sup>T</sup>K<sup>L</sup>E<sup>I</sup>K (SEQ ID  
NO:110)

Аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи 4F11  
мышцы

QIVLTQSPA<sup>I</sup>V<sup>S</sup>A<sup>S</sup>P<sup>G</sup>E<sup>K</sup>V<sup>T</sup>M<sup>T</sup>C<sup>S</sup>A<sup>S</sup>S<sup>S</sup>V<sup>S</sup>Y<sup>M</sup>Y<sup>W</sup>Y<sup>Q</sup>Q<sup>R</sup>P<sup>G</sup>S<sup>S</sup>P<sup>R</sup>L<sup>L</sup>I<sup>Y</sup>D<sup>T</sup>S<sup>S</sup>L<sup>A</sup>S<sup>G</sup>  
V<sup>P</sup>V<sup>R</sup>F<sup>S</sup>G<sup>S</sup>G<sup>S</sup>G<sup>T</sup>S<sup>Y</sup>L<sup>T</sup>I<sup>S</sup>R<sup>I</sup>E<sup>S</sup>E<sup>D</sup>A<sup>A</sup>N<sup>Y</sup>Y<sup>C</sup>Q<sup>Q</sup>W<sup>N</sup>S<sup>D</sup>P<sup>Y</sup>T<sup>F</sup>G<sup>G</sup>G<sup>T</sup>K<sup>L</sup>E<sup>I</sup>K (SEQ ID  
NO:111)

Аминокислотная последовательность домена 1 Siglec-8 человека

M<sup>E</sup>G<sup>D</sup>R<sup>Q</sup>Y<sup>G</sup>D<sup>G</sup>Y<sup>L</sup>L<sup>Q</sup>V<sup>Q</sup>E<sup>L</sup>V<sup>T</sup>V<sup>Q</sup>E<sup>G</sup>L<sup>C</sup>V<sup>H</sup>V<sup>P</sup>C<sup>S</sup>F<sup>S</sup>Y<sup>P</sup>Q<sup>D</sup>G<sup>W</sup>T<sup>D</sup>S<sup>D</sup>P<sup>V</sup>H<sup>G</sup>Y<sup>W</sup>F<sup>R</sup>  
A<sup>G</sup>D<sup>R</sup>P<sup>Y</sup>Q<sup>D</sup>A<sup>P</sup>V<sup>A</sup>T<sup>N</sup>N<sup>P</sup>D<sup>R</sup>E<sup>V</sup>Q<sup>A</sup>E<sup>T</sup>Q<sup>G</sup>R<sup>F</sup>Q<sup>L</sup>L<sup>G</sup>D<sup>I</sup>W<sup>S</sup>N<sup>D</sup>C<sup>S</sup>L<sup>S</sup>I<sup>R</sup>D<sup>A</sup>R<sup>K</sup>R<sup>D</sup>K<sup>G</sup>S<sup>Y</sup>F<sup>F</sup>R<sup>L</sup>E  
R<sup>G</sup>S<sup>M</sup>K<sup>W</sup>S<sup>Y</sup>K<sup>S</sup>Q<sup>L</sup>N<sup>Y</sup>K<sup>T</sup>K<sup>Q</sup>L<sup>S</sup>V<sup>F</sup>V<sup>T</sup>A<sup>L</sup>T<sup>H</sup>R<sup>P</sup> (SEQ ID NO:112)

Аминокислотная последовательность домена 2 Siglec-8 человека

D<sup>I</sup>L<sup>I</sup>L<sup>G</sup>T<sup>L</sup>E<sup>S</sup>G<sup>H</sup>S<sup>R</sup>N<sup>L</sup>T<sup>C</sup>S<sup>V</sup>P<sup>W</sup>A<sup>C</sup>K<sup>Q</sup>G<sup>T</sup>P<sup>P</sup>M<sup>I</sup>S<sup>W</sup>I<sup>G</sup>A<sup>S</sup>V<sup>S</sup>S<sup>P</sup>G<sup>P</sup>T<sup>T</sup>A<sup>R</sup>S<sup>S</sup>V<sup>L</sup>T<sup>L</sup>T<sup>P</sup>K  
P<sup>Q</sup>D<sup>H</sup>G<sup>T</sup>S<sup>L</sup>T<sup>C</sup>Q<sup>V</sup>T<sup>L</sup>P<sup>G</sup>T<sup>G</sup>V<sup>T</sup>T<sup>T</sup>S<sup>T</sup>V<sup>R</sup>L<sup>D</sup>V<sup>S</sup> (SEQ ID NO:113)

Аминокислотная последовательность домена 3 Siglec-8 человека

YPPWNLMTVFQGDASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRG  
SLTLCPSRSSNPGLLELPRVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTTGSRPVSQ  
VTLAAVGG (SEQ ID NO:114)

Аминокислотная последовательность слитого белка домена 1 Siglec-8 человека

MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFR  
AGDRPYQDAPVATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIEWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLE  
RGSWKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTHRPIEGRSDKTHHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPP  
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:115)

Аминокислотная последовательность слитого белка домена 1 и 2 Siglec-8 человека

MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFR  
AGDRPYQDAPVATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIEWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLE  
RGSWKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHSRNLTCVSPWACKQGTP  
PMISWIGASVSSPGPTTARSSVLTLPKPKQDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSIEG  
RSDKTHHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI  
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP  
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID  
NO:116)

Аминокислотная последовательность слитого белка доменов 1, 2 и 3 Siglec-8 человека

MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFR  
AGDRPYQDAPVATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIEWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLE  
RGSWKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHSRNLTCVSPWACKQGTP  
PMISWIGASVSSPGPTTARSSVLTLPKPKQDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYP  
WNLMTVFQGDASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSR  
SSNPGLLELPRVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTTGSRPVSQVTLAAV  
GIEGRSDKTHHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF  
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK  
(SEQ ID NO:117)

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ лечения или профилактики одного или нескольких симптомов гастрита, энтерита, дуоденита или гастроэнтерита у индивидуума, включающий:

(a) определение количества тучных клеток в первом образце, полученном из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки индивидуума;

(b) определение количества эозинофилов во втором образце, полученном из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки индивидуума; и

(c) если первый образец имеет увеличенное число тучных клеток по сравнению с эталоном тучных клеток и второй образец не имеет повышенное количество эозинофилов по сравнению с эталоном эозинофилов, введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека.

2. Способ лечения или профилактики одного или нескольких симптомов гастрита, энтерита, дуоденита или гастроэнтерита у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, отличающийся тем, что индивидуум имеет повышенное количество тучных клеток, по меньшей мере, в части слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки по сравнению с эталоном тучных клеток, и при этом индивидуум не имеет повышенного количества эозинофилов, по меньшей мере, в части слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки по сравнению с эталоном эозинофилов.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что первый образец, полученный из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки индивидуума, имеет повышенное количество тучных клеток по сравнению с эталоном тучных клеток, и тем, что второй образец, полученный из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки индивидуума не имеет повышенное количество эозинофилов по сравнению с эталоном эозинофилов.

4. Способ по п. 1 или п. 3, отличающийся тем, что первый и второй образцы являются одним и тем же.

5. Способ по любому из пп. 1, 3 и 4, отличающийся тем, что один или оба из первого и второго образцов взяты из биопсии желудка или двенадцатиперстной кишки.

6. Способ по любому из пп. 1, 3 и 4, отличающийся тем, что один или оба из первого и второго образцов взяты при эзофагогастродуоденоскопии (EGD) с биопсией.

7. Способ по любому из пп. 1, 3 и 4-6, отличающийся тем, что первый образец имеет, по меньшей мере, одно поле зрения при большом увеличении (HPF), которое имеет количество тучных клеток 20 или более тучных клеток в HPF.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что тучные клетки определяют

иммуногистохимическим (ИНС) окрашиванием на триптазу, CD117 или рецептор IgE.

9. Способ по любому из пп. 1, 3 и 4-8, отличающийся тем, что второй образец содержит одно или несколько HPF, где каждое имеет количество эозинофилов менее 30 эозинофилов в HPF.

10. Способ по любому из пп. 1, 3 и 4-8, отличающийся тем, что второй образец получают из слизистой оболочки желудка индивидуума, и тем, что второй образец не имеет, по меньшей мере, пять HPF, где каждое из них имеет количество эозинофилов 30 или более эозинофилов в HPF.

11. Способ по любому из пп. 1, 3 и 4-8, отличающийся тем, что второй образец получают из слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки индивидуума, и тем, что второй образец не имеет, по меньшей мере, три HPF, где каждое из них имеет количество эозинофилов 30 или более эозинофилов в HPF.

12. Способ по любому из пп. 1, 3 и 4-11, отличающийся тем, что количество тучных клеток в первом образце определяют за 45 дней или менее до введения композиции.

13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что индивидуум имеет, или ему был поставлен диагноз гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (GERD).

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что индивидуум невосприимчив к лечению антацидом, блокатором H<sub>2</sub> и/или ингибитором протонной помпы.

15. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что индивидуум имеет, или ему был поставлен диагноз синдром раздраженной толстой кишки (IBS).

16. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что индивидуум имеет, или ему был поставлен диагноз функциональная диспепсия.

17. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что индивидуум имел, или ему ранее был поставлен диагноз эозинофильный гастрит, и тем, что индивидуум имеет один или несколько симптомов эозинофильного гастрита без повышенных эозинофилов.

18. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что индивидуум имел, или ему ранее был поставлен диагноз эозинофильный гастроэнтерит, и тем, что индивидуум имеет один или несколько симптомов эозинофильного гастроэнтерита без повышенных эозинофилов.

19. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что одно или оба из количества или активности тучных клеток в образце, полученном из слизистой оболочки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки или толстой кишки индивидуума снижаются после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции.

20. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что перед введением композиции, индивидуум не достиг успеха или у него отсутствует надлежащий контроль одним или несколькими способами лечения по стандарту лечения гастрита или гастроэнтерита.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что один или несколько способов лечения

по стандарту лечения гастрита или гастроэнтерита выбраны из группы, состоящей из лечения ингибитором протонной помпы (PPI), лечения кортикостероидами и диетического лечения.

22. Способ по любому из пп. 1-21, в котором один или несколько симптомов гастрита, дуоденита, энтерита или гастроэнтерита у индивидуума снижаются после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции.

23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что один или несколько симптомов гастрита, дуоденита, энтерита или гастроэнтерита у индивидуума снижаются, по меньшей мере, на 60% после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции.

24. Способ по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что один или несколько из боли в животе, тошноты, рвоты, потери аппетита, спастических болей в животе, насыщения до окончания еды, вздутия живота, диареи, жидкого или водянистого стула у индивидуума уменьшаются после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции.

25. Способ лечения или профилактики одного или нескольких симптомов эзофагита у индивидуума, включающий:

(а) определение количества тучных клеток в первом образце, полученном из слизистой оболочки пищевода индивидуума;

(б) определение количества эозинофилов во втором образце, полученном из слизистой оболочки пищевода индивидуума; и

(с) если первый образец имеет повышенное количество тучных клеток, по сравнению с эталоном тучных клеток, а второй образец не имеет повышенного количества эозинофилов по сравнению с эталоном эозинофилов, введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека.

26. Способ лечения или профилактики одного или нескольких симптомов эзофагита у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, отличающийся тем, что индивидуум имеет повышенное количество тучных клеток, по меньшей мере, в части слизистой оболочки пищевода по сравнению с эталоном тучных клеток, и тем, что индивидуум не имеет повышенного количества эозинофилов, по меньшей мере, в части слизистой оболочки пищевода по сравнению с эталоном эозинофилов.

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что первый образец, полученный из слизистой оболочки пищевода индивидуума, имеет повышенное количество тучных клеток по сравнению с эталоном тучных клеток, и тем, что второй образец, полученный из слизистой оболочки пищевода индивидуума, не имеет увеличенного количества эозинофилов по сравнению с эталоном эозинофилов.

28. Способ по п. 25 или п. 27, в котором первый и второй образцы являются одним

и тем же.

29. Способ по любому из пп. 25, 27 и 28, отличающийся тем, что один или оба из первого и второго образцов взяты из образца биопсии пищевода.

30. Способ по любому из пп. 25, 27 и 28, отличающийся тем, что один или оба из первого и второго образцов взяты при эзофагогастродуоденоскопии (EGD) с биопсией.

31. Способ по любому из пп. 25, 27, и 28-30, отличающийся тем, что первый образец имеет, по меньшей мере, одно поле зрения (HPF) с количеством тучных клеток 10 или более тучных клеток в HPF.

32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что тучные клетки определяют иммуногистохимическим (ИНС) окрашиванием на триптазу, CD117 или рецептор IgE.

33. Способ по любому из пп. 25, 27, и 28-32, отличающийся тем, что второй образец содержит одно или несколько HPF с количеством эозинофилов менее 15 эозинофилов в HPF.

34. Способ по любому из пп. 25, 27, и 28-32, отличающийся тем, что второй образец не имеет HPF с количеством эозинофилов 15 или более эозинофилов в HPF.

35. Способ по любому из пп. 25-34, отличающийся тем, что индивидуум имеет, или ему был поставлен диагноз гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (GERD).

36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что индивидуум невосприимчив к лечению антацидом, блокатором H<sub>2</sub> и/или ингибитором протонной помпы.

37. Способ по любому из пп. 25-36, в котором одно или несколько из количества, активности, или местонахождения тучных клеток в образце, полученном из слизистой оболочки пищевода индивидуума, снижается после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции.

38. Способ по любому из пп. 25-37, отличающийся тем, что перед введением композиции, индивидуум не достиг успеха или у него отсутствует надлежащий контроль одним или несколькими способами лечения по стандарту лечения эзофагита.

39. Способ по любому из пп. 25-38, отличающийся тем, что один или несколько симптомов эзофагита у индивидуума уменьшаются после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции.

40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что один или несколько симптомов эзофагита у индивидуума уменьшаются, по меньшей мере, на 60% после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции.

41. Способ по любому из пп. 25-38, в котором один или несколько из изжоги, тошноты, дисфагии/затрудненного глотания, рвоты, боли в животе, кашля, застревания пищи, раннего насыщения, потери аппетита, боли в груди, пищевой непереносимости или отказа и гастроэзофагеального рефлюкса у индивидуума уменьшаются после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции.

42. Способ лечения или профилактики одного или нескольких симптомов колита у индивидуума, включающий:

(а) определение количества тучных клеток в первом образце, полученном из

слизистой оболочки толстой кишки индивидуума;

(b) определение количества эозинофилов во втором образце, полученном из слизистой оболочки толстой кишки индивидуума; и

(c) если первый образец имеет повышенное количество тучных клеток по сравнению с эталоном тучных клеток, а второй образец не имеет повышенного количества эозинофилов по сравнению с эталоном эозинофилов, введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека.

43. Способ лечения или профилактики одного или нескольких симптомов колита у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, отличающийся тем, что индивидуум имеет повышенное количество тучных клеток, по меньшей мере, в части слизистой оболочки толстой кишки, по сравнению с эталоном тучных клеток, и тем, что индивидуум не имеет повышенного количества эозинофилов, по меньшей мере, в части слизистой оболочки толстой кишки, по сравнению с эталоном эозинофилов.

44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что первый образец, полученный из слизистой оболочки толстой кишки индивидуума, имеет повышенное количество тучных клеток по сравнению с эталоном тучных клеток, и тем, что второй образец, полученный из слизистой оболочки толстой кишки индивидуума, не имеет повышенного количества эозинофилов по сравнению с эталоном эозинофилов.

45. Способ по п. 42 или п. 44, отличающийся тем, что первый и второй образцы являются одним и тем же.

46. Способ по любому из пп. 42-45, отличающийся тем, что колитом является язвенный колит.

47. Способ по любому из пп. 42-46, отличающийся тем, что первый образец имеет, по меньшей мере, одно поле зрения (HPF) с количеством тучных клеток 30 или более тучных клеток в HPF.

48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что тучные клетки определяют иммуногистохимическим (ИНС) окрашиванием на триптазу, рецептор CD117 или IgE.

49. Способ по любому из пп. 42-48, отличающийся тем, что второй образец содержит одно или несколько HPF с количеством эозинофилов менее 60 эозинофилов в HPF.

50. Способ по любому из пп. 42-48, отличающийся тем, что второй образец не имеет HPF с количеством эозинофилов 60 или более эозинофилов в HPF.

51. Способ по любому из пп. 42-50, отличающийся тем, что количество тучных клеток в первом образце определяют за 45 дней или менее до введения композиции.

52. Способ по любому из пп. 42-51, отличающийся тем, что индивидуум имел, или ему ранее был поставлен диагноз эозинофильный колит, и тем, что индивидуум имеет один или несколько симптомов эозинофильного колита без повышенных эозинофилов.

53. Способ по любому из пп. 42-52, в котором одно или оба из количества или активности тучных клеток в образце, полученном из слизистой оболочки толстой кишки индивидуума, снижается после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции.

54. Способ по любому из пп. 42-53, отличающийся тем, что перед введением композиции, индивидуум не достиг успеха или у него отсутствует надлежащий контроль одним или несколькими способами лечения по стандарту лечения колита.

55. Способ по любому из пп. 42-54, отличающийся тем, что один или несколько симптомов колита у индивидуума уменьшаются после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции.

56. Способ по п. 55, отличающийся тем, что один или несколько симптомов колита у индивидуума уменьшаются, по меньшей мере, на 60% после введения композиции по сравнению с исходным уровнем до введения композиции.

57. Способ по любому из пп. 1-56, в котором композицию вводят путем внутривенной инфузии.

58. Способ по п. 57, отличающийся тем, что композицию вводят внутривенной инфузией один раз в месяц в течение 3 или более месяцев.

59. Способ по любому из пп. 1-56, в котором композицию вводят путем подкожной инъекции.

60. Способ по любому из пп. 1-56, в котором композицию вводят внутривенной инфузией одной или несколькими дозами, содержащими от примерно 0,3 мг/кг до 3,0 мг/кг антитела.

61. Способ по любому из пп. 1-56, отличающийся тем, что способ включает введение индивидууму первой дозы, содержащей примерно 0,3 мг/кг антитела, второй дозы, содержащей примерно 1,0 мг/кг антитела, и третьей дозы, содержащей примерно 3,0 мг/кг антитела.

62. Способ по п. 61, отличающийся тем, что способ включает введение индивидууму первой дозы, содержащей примерно 0,3 мг/кг антитела в день 1, второй дозы, содержащей примерно 1,0 мг/кг антитела, между днем 26 и днем 32, и третьей дозы, содержащей примерно 3,0 мг/кг антитела между днем 54 и днем 60, четвертой дозы, содержащей примерно 3,0 мг/кг антитела между днем 82 и днем 88 днями, пятой дозы, содержащей примерно 3,0 мг/кг антитела между днем 110 и днем 116, и шестой дозы, содержащей примерно 3,0 мг/кг антитела, между днем 138 и днем 144.

63. Способ по любому из пп. 1-62, отличающийся тем, что антитело содержит Fc область и углеводные цепи, связанные с N-гликозидом, связанные с Fc областью, где менее 50% от углеводных цепей антитела, связанных с N-гликозидом, в композиции содержат фукозный остаток.

64. Способ по п. 63, отличающийся тем, что по существу ни одна из углеводных цепей антитела, связанных с N-гликозидом, в композиции не содержит фукозный остаток.

65. Способ по любому из пп. 1-64, отличающийся тем, что антитело содержит

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

66. Способ по любому из пп. 1-64, отличающийся тем, что указанное антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 67-70; и/или где вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71.

67. Способ по любому из пп. 1-64, отличающийся тем, что антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16 или 21.

68. Способ по любому из пп. 1-64, отличающийся тем, что антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11-14; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23-24.

69. Способ по любому из пп. 1-64, отличающийся тем, что антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2-14; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16-24.

70. Способ по любому из пп. 1-64, отличающийся тем, что антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2-10; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16-22.

71. Способ по любому из пп. 1-64, отличающийся тем, что антитело содержит:

(а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

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

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

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

(4) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62;  
(5) HC-FR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 38-43;

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

(7) HC-FR4, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 45-46, и/или

(b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:

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

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

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

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

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

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

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

72. Способ по любому из пп. 1-64, отличающийся тем, что антитело содержит:

(a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

(1) HC-FR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26;

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

(3) HC-FR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34;

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

(5) HC-FR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38;

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

(7) HC-FR4, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45;

и/или

(b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:

(1) LC-FR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48;

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

(3) LC-FR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51;

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

(5) LC-FR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55;

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

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

73. Способ по любому из пп. 1-64, отличающийся тем, что антитело содержит:

(a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

(1) HC-FR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26;

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

(3) HC-FR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34;

- (4) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62;
- (5) HC-FR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38;
- (6) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и
- (7) HC-FR4, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45;

и/или

(b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:

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

74. Способ по любому из пп. 1-64, отличающийся тем, что антитело содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и (iii) HVR -L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103;

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

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

75. Способ по любому из пп. 1-64, отличающийся тем, что антитело содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 107; и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110; или

переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108; и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111.

76. Способ по любому из пп. 1-64, отличающийся тем, что антитело связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 примата, не являющегося человеком.

77. Способ по п. 76, отличающийся тем, что приматом, не являющимся человеком, является павиан.

78. Способ по п. 76, отличающийся тем, что антитело связывается с эпитопом в домене 1 Siglec-8 человека, где домен 1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112.

79. Способ по п. 76, отличающийся тем, что антитело связывается с эпитопом в домене 3 Siglec-8 человека, где домен 3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114.

80. Способ по п. 76, отличающийся тем, что антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело 4F11.

81. Способ по любому из пп. 1-64, где антитело связывается с эпитопом в домене 2 или домене 3 Siglec-8 человека.

82. Способ по п. 81, отличающийся тем, что домен 2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113.

83. Способ по п. 81, отличающийся тем, что антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело 1C3.

84. Способ по п. 81, отличающийся тем, что домен 3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114.

85. Способ по п. 81, отличающийся тем, что антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело 1H10.

86. Способ по любому из пп. 1-64, где антитело связывается с эпитопом в домене 1 Siglec-8 человека и конкурирует с антителом 4F11 для связывания с Siglec-8.

87. Способ по п. 86, отличающийся тем, что антитело не конкурирует с антителом 2E2 за связывание с Siglec-8.

88. Способ по п. 87, отличающийся тем, что антитело не является антителом 2E2.

89. Способ по п. 86, отличающийся тем, что домен 1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112.

90. Способ по любому из пп. 65-89, отличающийся тем, что антителом является антитело человека, гуманизированное антитело или химерное антитело.

91. Способ по любому из пп. 65-90, отличающийся тем, что антитело истощает эозинофилы в крови и ингибирует активацию тучных клеток.

92. Способ по любому из пп. 65-91, отличающийся тем, что антитело содержит Fc область тяжелой цепи, содержащую Fc область IgG человека.

93. Способ по п. 92, отличающийся тем, что Fc область IgG человека содержит Fc область IgG1 человека.

94. Способ по п. 93, отличающийся тем, что Fc область IgG1 человека не фукозилирована.

95. Способ по п. 92, отличающийся тем, что Fc область IgG человека содержит Fc область IgG4 человека.

96. Способ по п. 95, отличающийся тем, что Fc область IgG4 человека содержит аминокислотную замену S228P, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, как в Kabat.

97. Способ по любому из пп. 65-89, отличающийся тем, что антитело сконструировано для улучшения активности антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).

98. Способ по п. 97, отличающийся тем, что антитело содержит, по меньшей мере, одну аминокислотную замену в Fc области, которая улучшает активность ADCC.

99. Способ по любому из пп. 65-91, отличающийся тем, что, по меньшей мере одна или две из тяжелых цепей антитела является не фукозилированной.

100. Способ по любому из пп. 1-64, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 76 или 77.

101. Способ по любому из пп. 1-100, отличающийся тем, что антителом является моноклональное антитело.

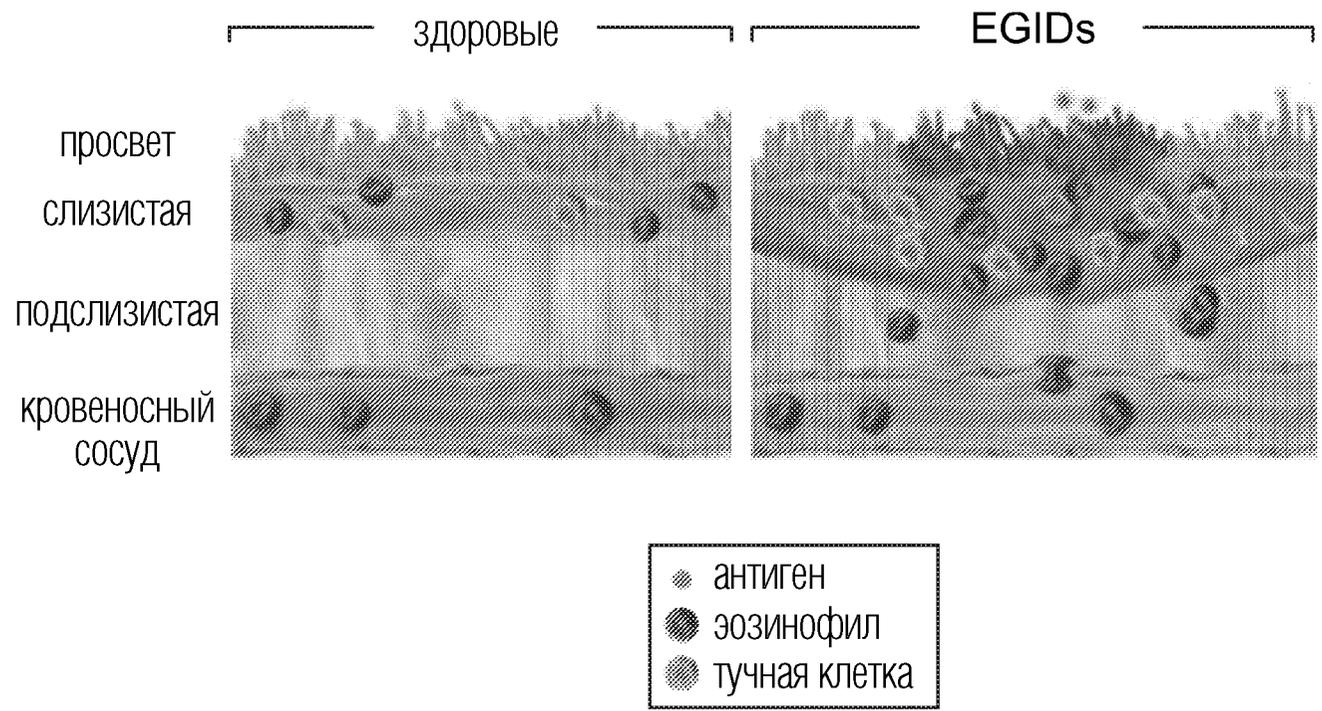
102. Способ по любому из пп. 1-101, отличающийся тем, что композицию вводят в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами для лечения или профилактики гастрита, гастроэнтерита или эзофагита.

103. Способ по п. 102, отличающийся тем, что один или несколько дополнительных терапевтических агентов для лечения или профилактики гастрита, гастроэнтерита или эзофагита выбраны из группы, состоящей из PPI, системных кортикостероидов, местных кортикостероидов, антигистаминных средств, стабилизаторов тучных клеток, H-2 блокаторов, анти-IgE антител, ингибиторов кальциневрина, иммуномодуляторов и иммунодепрессантов.

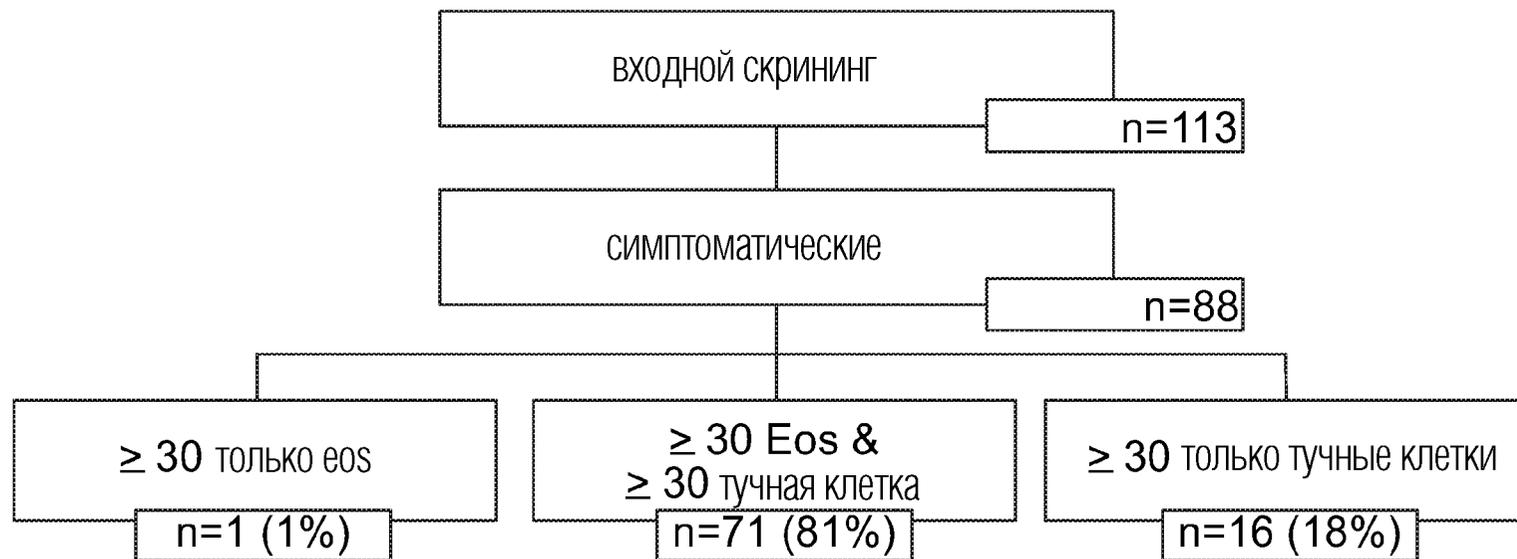
104. Способ по любому из пп. 1-103, отличающийся тем, что индивидуумом является человек.

105. Способ по любому из пп. 1-104, отличающийся тем, что композицией является фармацевтическая композиция, содержащая антитело и фармацевтически приемлемый носитель.

106. Изделие, содержащее лекарственное средство, включающее композицию, содержащую антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, и вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению лекарственного средства индивидууму, нуждающемуся в этом, по любому из пп. 1-105.



ФИГ. 1



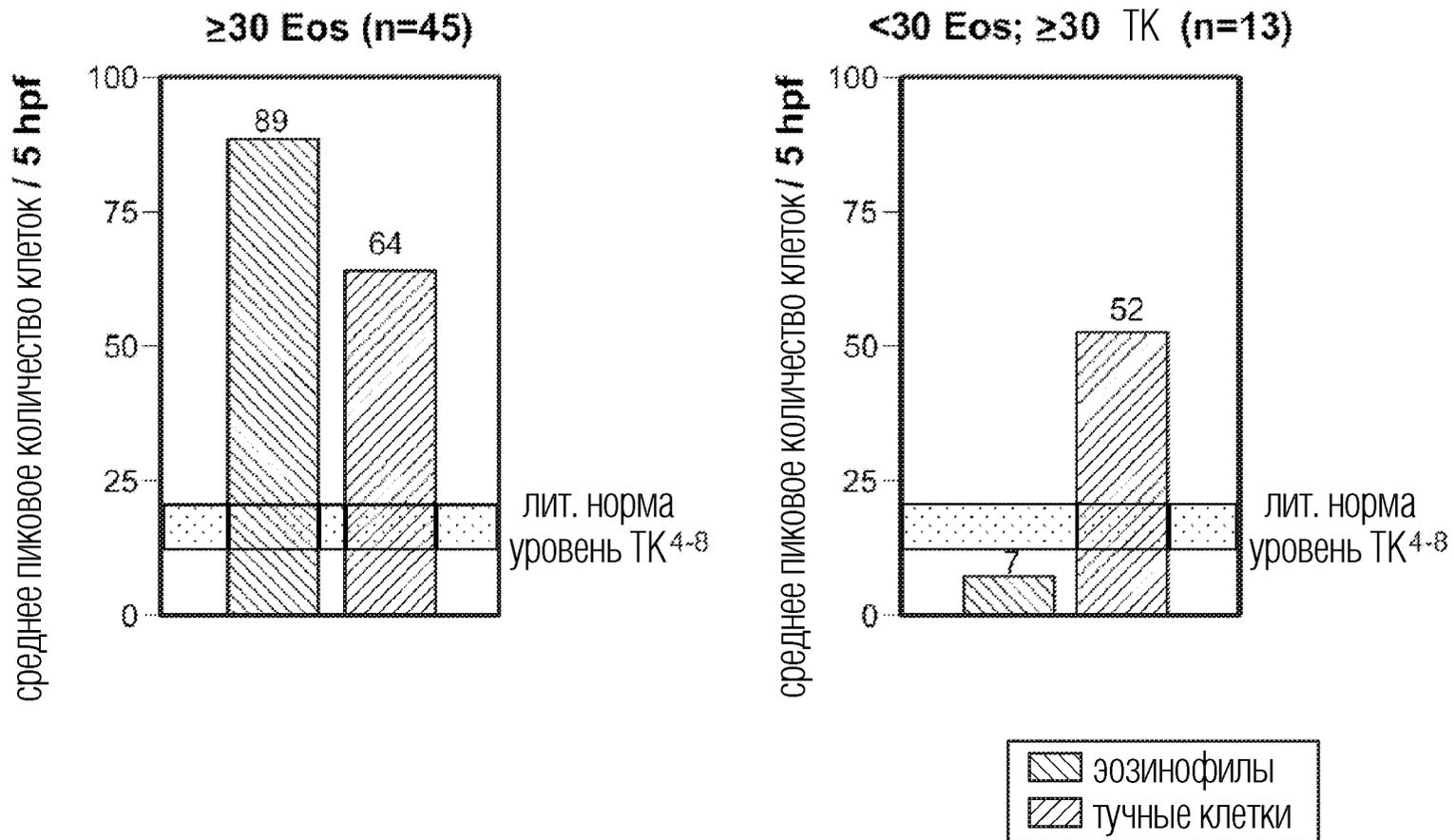
\*87 из 88 симптоматических пациентов имели повышенное количество тучных клеток

ФИГ. 2А

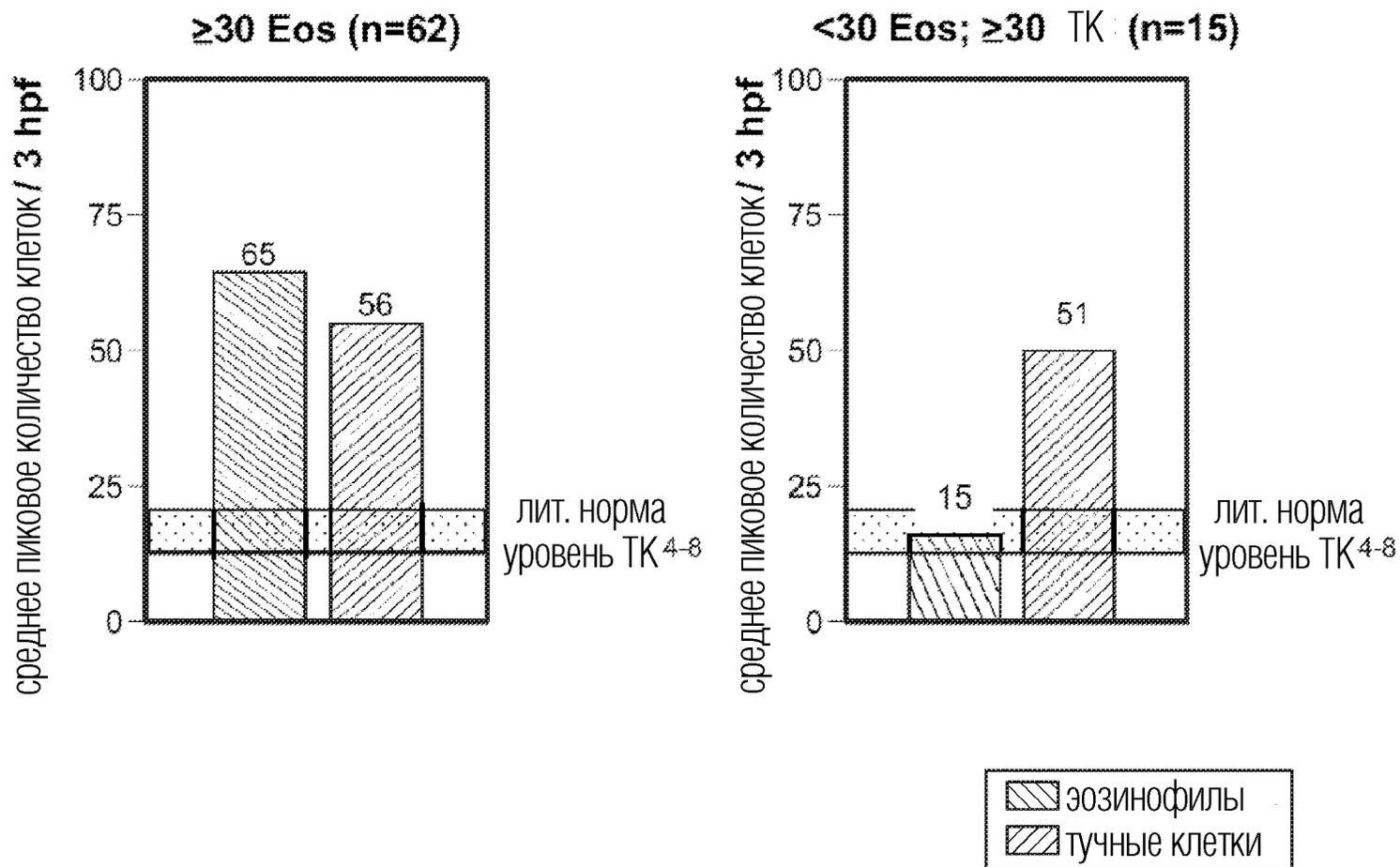
	<b>≥ 30 Eos (n=72)</b>	<b>&lt;30 Eos; ≥30 ТК (n=16)</b>
возраст, лет в среднем (интервал)	41 (18-74)	50 (19-78)
ЖЕНЩИНЫ, n (%)	43 (60%)	11 (69%)
РАСА - БЕЛАЯ, n (%)	66 (92%)	14 (88%)
АНАМНЕЗ АТОПИИ/АЛЛЕРГИИ <sup>a</sup> , n (%)	53 (74%)	5 (31%)
eos в крови (клетки/мкл), среднее	662	106

<sup>a</sup> Медицинский анамнез при скрининге астмы, ринита, пищевой аллергии, атопического дерматита, сезонной аллергии, экзогенная аллергия или аллергия на пыльцу

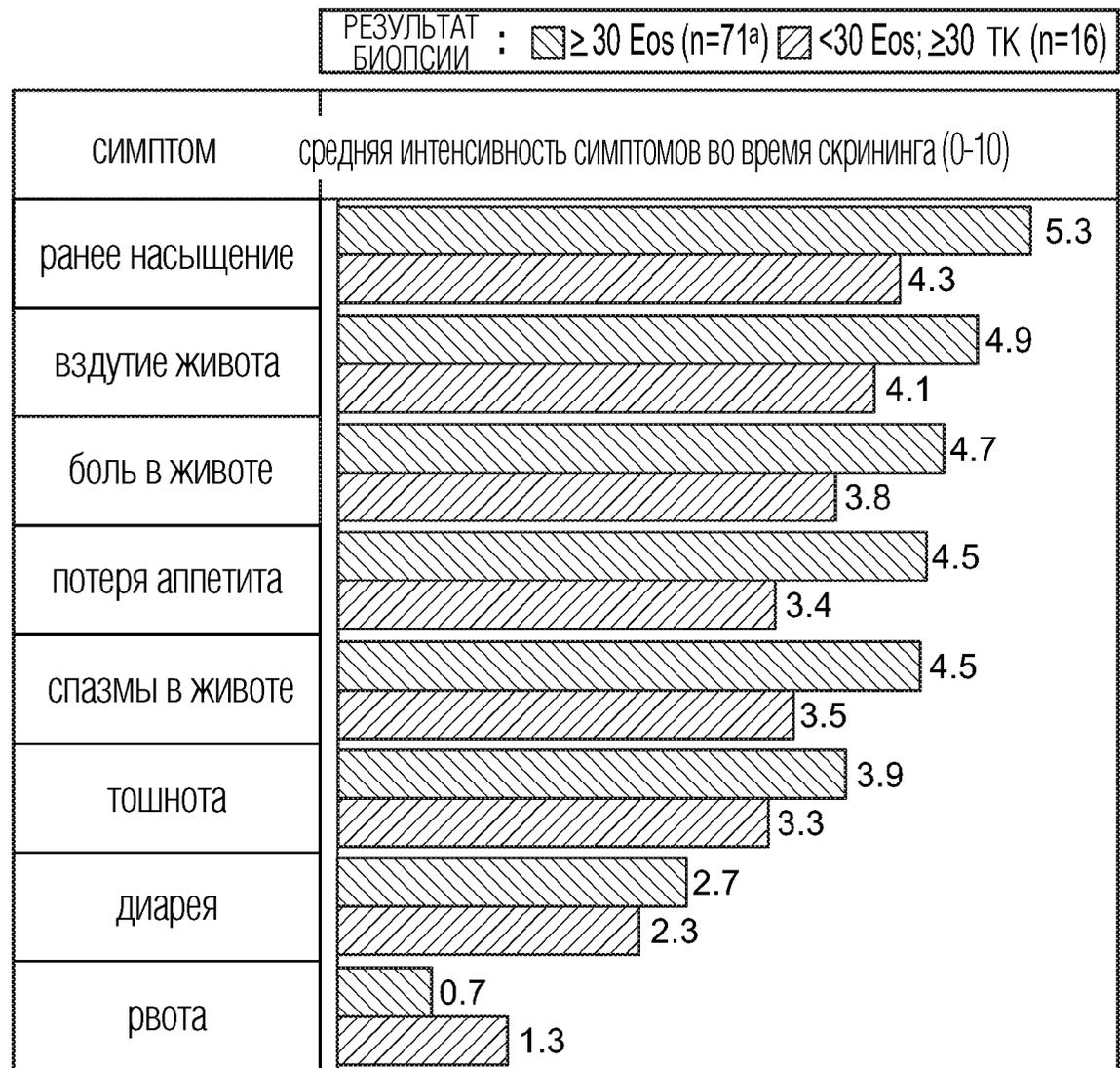
**ФИГ. 2В**



ФИГ. 3А



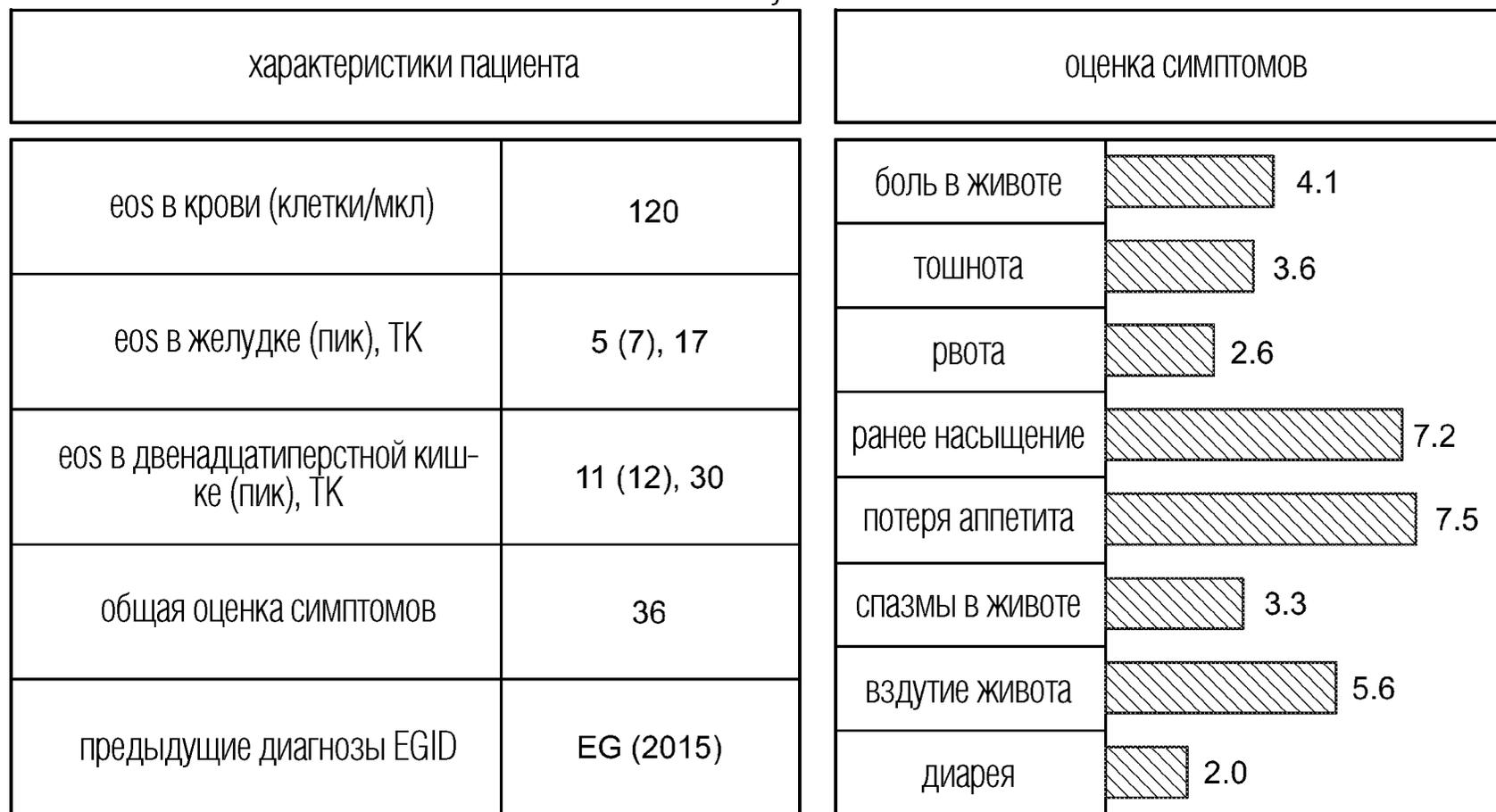
ФИГ. 3В



<sup>a</sup> для одного пациента отсутствовали данные по симптомам и его не включили в ENIGMA

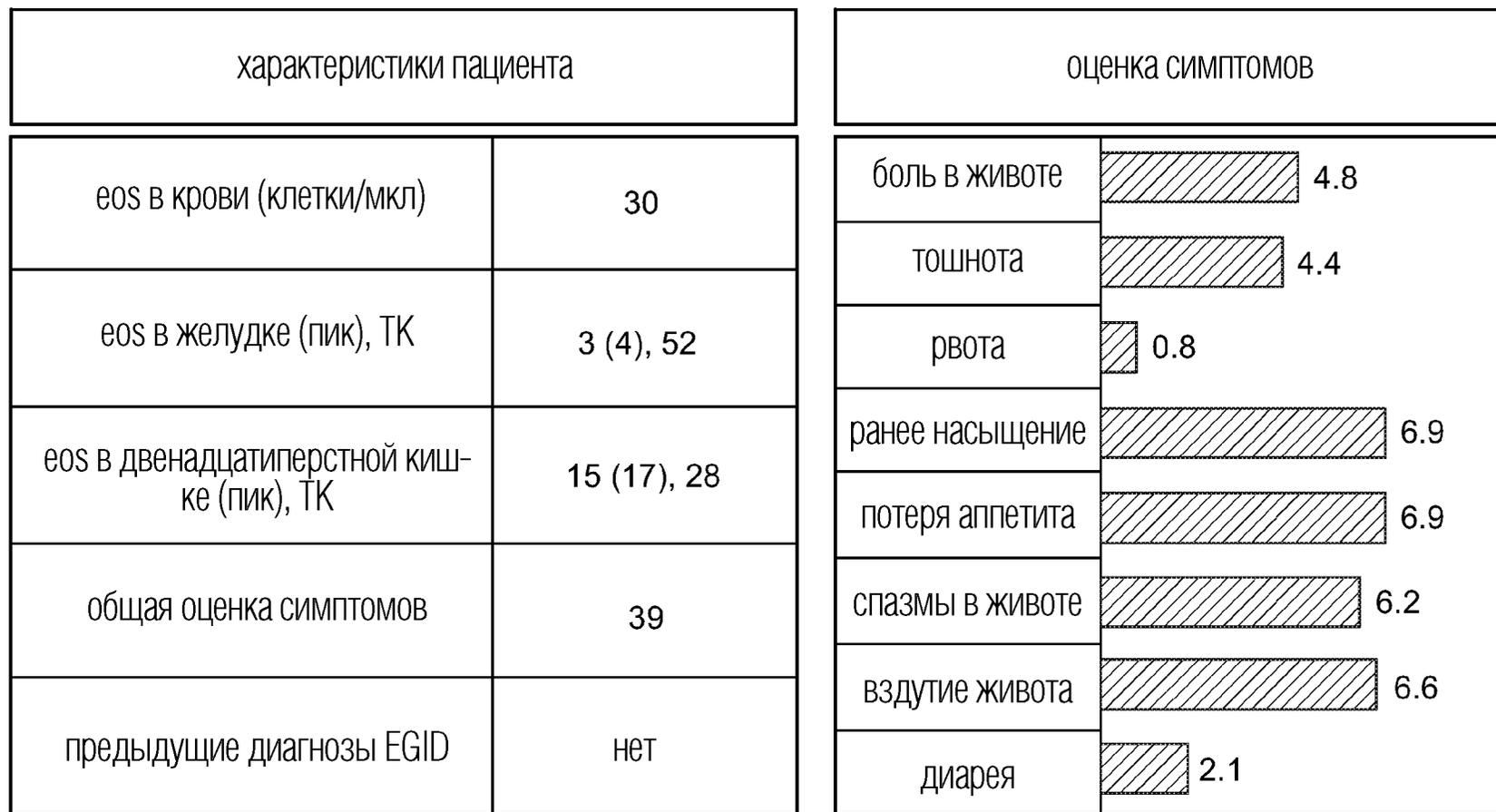
ФИГ. 4

исследование клиниче-  
ского случая А

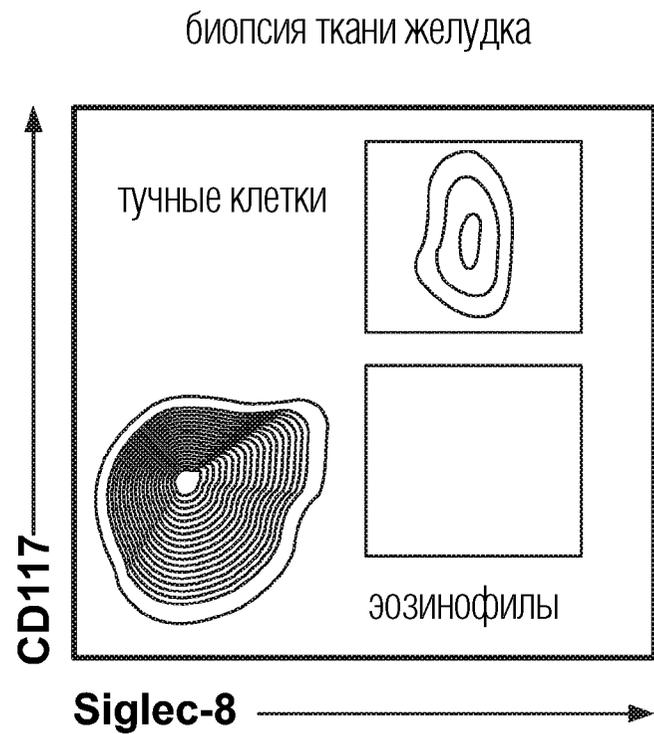


ФИГ. 5А

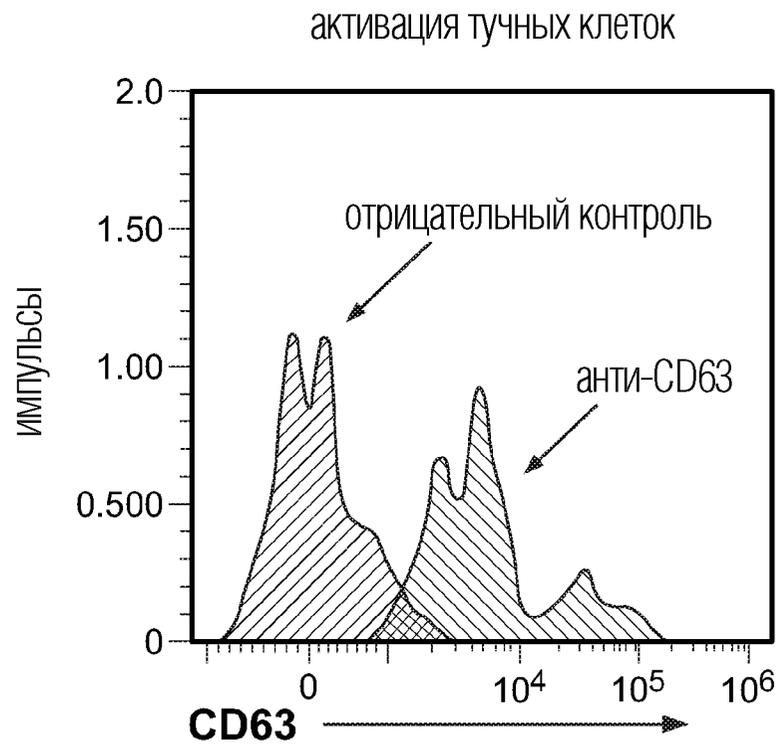
исследование клиниче-  
ского случая В



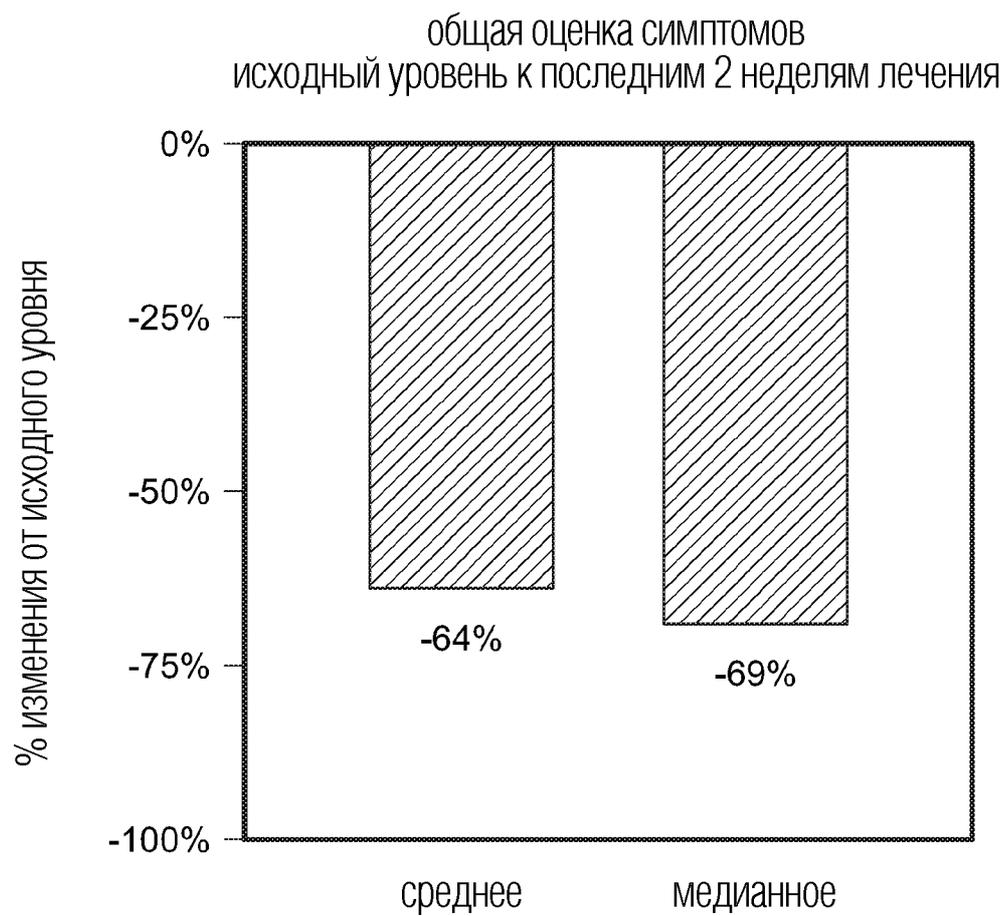
ФИГ. 5В



ФИГ. 6А



ФИГ. 6В



ФИГ. 7