

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290455** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.06.17

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 31/573 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.07.31

(54) **СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ АНТИ-SIGLEC-8 АНТИТЕЛ И КОРТИКОСТЕРОИДОВ**

(31) 62/882,330

(72) Изобретатель:

(32) 2019.08.02

**Сингх Бхупиндер, Расмуссен Хенрик
(US)**

(33) US

(86) PCT/US2020/044583

(74) Представитель:

(87) WO 2021/026021 2021.02.11

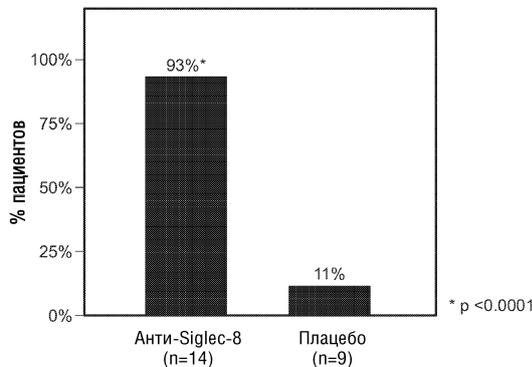
Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

АЛЛАКОС ИНК. (US)

(57) В настоящем изобретении представлены способы и наборы, подходящие для введения композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, например, человеку, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления кортикостероид вводят индивидууму по меньшей мере за 6 ч, по меньшей мере за 12 ч или за 12-24 ч до первой дозы композиции, содержащей анти-Siglec-8 антитело.

Эозинофилы пищевода <5/NPF



A1

202290455

202290455

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572959EA/032

СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ АНТИ-SIGLEC-8 АНТИТЕЛ И КОРТИКОСТЕРОИДОВ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По данной заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США с серийным № 62/882,330, поданной 2 августа 2019 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

ПОДАЧА ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

Содержание следующего поддачи в текстовом файле ASCII полностью включено в настоящий документ посредством ссылки: машиночитаемая форма (CRF) Перечня последовательностей (имя файла: 701712001240SEQLIST.TXT, дата записи: 20 июля 2020 г., размер: 113 КБ).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к способам и наборам, подходящим для введения композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, *например*, человеку, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят, по меньшей мере, за 6 часов, по меньшей мере, за 12 часов или за 12-24 часа до первой дозы композиции, содержащей анти-Siglec-8 антитело.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Siglec (иммуноглобулин-подобные лектины, связывающие сиаловую кислоту) представляют собой однопроходные трансмембранные белки клеточной поверхности, обнаруживаемые преимущественно на лейкоцитах, и характеризующиеся своей специфичностью в отношении сиаловых кислот, присоединенных к гликоконъюгатам клеточной поверхности. Семейство Siglec включает, по меньшей мере, 15 членов, которые встречаются у млекопитающих (Pillai et al., Annu Rev Immunol., 2012, 30:357-392). Эти члены включают сиалoadгезин (Siglec-1), CD22 (Siglec-2), CD33 (Siglec-3), миелин-ассоциированный гликопротеин (Siglec-4), Siglec-5, OBBP1 (Siglec-6), AIRM1 (Siglec-7), SAF-2 (Siglec-8) и CD329 (Siglec-9). Siglec-8, член, который экспрессируется у людей, но не у мышей, был впервые обнаружен в рамках попыток идентифицировать новые белки эозинофилов человека. Помимо экспрессии эозинофилами, он также экспрессируется тучными клетками и базофилами. Siglec-8 распознает сульфатированный гликан, *т.е.* 6'-сульфосиалил Lewis X или 6'-сульфосиалил-N-ацетил-S-лактозамин, и содержит внутриклеточный домен иммунорецепторного тирозинового ингибирующего мотива (ITIM), который, как показано, ингибирует функцию тучных клеток.

Наряду с тучными клетками, эозинофилы могут способствовать воспалительному ответу, который играет полезную функциональную роль, такую как контроль инфекции в определенном участке ткани. Во время воспалительной реакции, апоптоз эозинофилов можно ингибировать за счет активности способствующих выживанию цитокинов, таких как IL-3 и GM-CSF. Однако, увеличение количества активированных эозинофилов, которые не удаляются быстро в результате апоптоза, может привести к высвобождению

белков эозинофильных гранул в уже воспаленных участках, что может привести к повреждению ткани и дальнейшему обострению воспаления. Было показано, что некоторые заболевания связаны с активацией эозинофилов, такие как синдром Чарга-Стросса, ревматоидный артрит и аллергическая астма (Wechsler et al., J Allergy Clin Immunol., 2012, 130(3):563-71). В настоящее время существует потребность в терапии, которая может контролировать активность иммунных клеток, участвующих в воспалении, например, активность эозинофилов и тучных клеток.

Предыдущие исследования показали, что эозинофилы подвергаются апоптозу, когда Siglec-8 перекрестно сшивается со специфическими антителами мыши, вырабатываемыми против внеклеточной части Siglec-8 (Nutku et al., Blood, 2003, 336:918-24). Эти антитела описаны в патенте США № 8,207,305, патенте США № 8,197,811, патенте США № 7,871,612 и патенте США № 7,557,191. Гуманизированные анти-Siglec-8 антитела описаны в патенте США № 9,546,215.

Антитела, которые связываются с Siglec-8 человека, проходят клинические испытания на здоровых добровольцах и пациентах с вялотекущим системным мастоцитозом (ISM), хронической крапивницей и аллергическим конъюнктивитом. На сегодняшний день лечение анти-Siglec-8 антителами хорошо переносится, где наиболее часто наблюдаемыми побочными эффектами являются инфузионные реакции (IRR). В то время как большинство IRR были легкими или умеренными, остается потребность в способах, которые улучшают лечение анти-Siglec-8 антителом, *например*, посредством профилактики и/или уменьшения тяжести IRR.

Все ссылки, цитируемые в настоящем документе, включая патентные заявки, патентные публикации и научную литературу, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки, как если бы каждая отдельная ссылка была конкретно и отдельно указана для включения посредством ссылки.

СУЩНОСТЬ

Для удовлетворения этой и других потребностей настоящее изобретение относится, *среди прочего*, к способам введения композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека.

Соответственно, некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам введения композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, индивидууму, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение кортикостероида индивидууму; и, по меньшей мере, через 6 часов после введения кортикостероида, введение индивидууму первой дозы композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение индивидууму первой дозы композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, где кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение индивидууму первой дозы композиции, где первую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в

течение примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, индивидуумом является человек.

В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 12 часов до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят индивидууму в течение 24 часов до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят индивидууму за 12-24 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид представляет собой преднизон, кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон или преднизолон. В некоторых вариантах осуществления, преднизон в дозе более 0,5 мг/кг вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов (и необязательно, в течение 24 часов), по меньшей мере, за 12 часов (и необязательно, в течение 24 часов) или за 12-24 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, от 0,5 мг/кг до 1 мг/кг преднизолон вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов (и необязательно, в течение 24 часов), по меньшей мере, за 12 часов (и необязательно, в течение 24 часов) или за 12-24 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, 1 мг/кг преднизолон вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов (и необязательно, в течение 24 часов), по меньшей мере, за 12 часов (и необязательно, в течение 24 часов) или за 12-24 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, 80 мг преднизолон вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов (и необязательно, в течение 24 часов), по меньшей мере, за 12 часов (и необязательно, в течение 24 часов) или за 12-24 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, 60 мг преднизолон вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов (и необязательно, в течение 24 часов), по меньшей мере, за 12 часов (и необязательно, в течение 24 часов) или за 12-24 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводится индивидуумом самостоятельно. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят индивидууму перорально. В некоторых вариантах осуществления, введение кортикостероида, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы снижает риск и/или тяжесть инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением первой дозы без введения кортикостероида, по меньшей мере, за 6 часов. В некоторых вариантах осуществления, введение кортикостероида, по меньшей мере, за 12 часов до введения первой дозы снижает риск и/или тяжесть инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением первой дозы без введения кортикостероида, по меньшей мере, за 12 часов. В некоторых вариантах осуществления, введение кортикостероида за 12-24 часа до введения первой дозы снижает риск и/или тяжесть инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением первой дозы без введения кортикостероида за 12-24 часа.

В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, антитело, которое связывается с

Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг в первой дозе. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от примерно 1 мг/кг до примерно 3 мг/кг в первой дозе. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в первой дозе 1 мг/кг или 3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, первую дозу композиции вводят индивидууму внутривенно. В некоторых вариантах осуществления, первую дозу композиции вводят индивидууму подкожно.

В некоторых вариантах осуществления, первую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, менее 50% от общего объема первой дозы вводят индивидууму в первые 2 часа инфузии. В некоторых вариантах осуществления, менее 30% от общего объема первой дозы вводят индивидууму в первые 2 часа инфузии. В некоторых вариантах осуществления, первую дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 1 мл/час в течение 15 минут, 5 мл/час в течение 15 минут, 10 мл/час в течение 30 минут, 15 мл/час в течение 30 минут, 25 мл/час в течение 30 минут, 30 мл/час в течение 30 минут, 35 мл/час в течение 30 минут и 40 мл/час в течение 62 минут. В некоторых вариантах осуществления, введение первой дозы композиции внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов снижает риск инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением первой дозы внутривенной инфузией в течение менее 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, введение первой дозы композиции внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов снижает тяжесть инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением первой дозы внутривенной инфузией в течение менее 4 часов.

В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, способы дополнительно включают введение кортикостероида индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид, вводимый индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы, представляет собой преднизон, кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон или преднизолон. В некоторых вариантах осуществления, индивидууму вводят более 0,5 мг/кг преднизона за 1-2 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, индивидууму вводят от 0,5 мг/кг до 1 мг/кг преднизона за 1-2 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, индивидууму вводят более 1 мг/кг преднизона за 1-2 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, 60 мг или 80 мг преднизона вводят индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят индивидууму перорально. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид, вводимый индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы, представляет собой метилпреднизолон. В некоторых вариантах осуществления, 100 мг метилпреднизолон вводят индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят индивидууму внутривенно.

В некоторых вариантах осуществления, способы дополнительно включают введение антигистаминного препарата индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, антигистаминный препарат представляет собой цетиризин. В некоторых вариантах осуществления, 10 мг цетиризина вводят индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, 10 мг цетиризина вводят индивидууму не менее чем за 40 минут и не более чем за 180 минут до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, 10 мг цетиризина вводят индивидууму за 40 минут - 180 минут до введения первой дозы (*например*, за 40 минут и 180 минут, включительно). В некоторых вариантах осуществления, антигистаминное средство вводят индивидууму перорально. В некоторых вариантах осуществления, способы дополнительно включают введение пациенту жаропонижающего или нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (NSAID) за 1-2 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, жаропонижающее средство представляет собой ацетаминофен. В некоторых вариантах осуществления, 975-1000 мг ацетаминофена вводят индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, 975-1000 мг ацетаминофена вводят индивидууму не менее чем за 40 минут и не более чем за 180 минут до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, жаропонижающее или NSAID вводят индивидууму перорально.

В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, способы дополнительно включают введение индивидууму второй дозы композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления, вторую дозу вводят индивидууму примерно через 28 дней после первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, вторую дозу вводят индивидууму примерно через 4 недели после первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, вторую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, менее 50% от общего объема второй дозы вводят индивидууму в первые 2 часа инфузии. В некоторых вариантах осуществления, менее 30% от общего объема второй дозы вводят индивидууму в первые 2 часа инфузии. В некоторых вариантах осуществления, вторую дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 1 мл/час в течение 15 минут, 5 мл/час в течение 15 минут, 10 мл/час в течение 30 минут, 15 мл/час в течение 30 минут, 25 мл/час в течение 30 минут, 30 мл/час в течение 30 минут, 35 мл/час в течение 30 минут и 40 мл/час в течение 62 минут. В некоторых вариантах осуществления, вторую дозу вводят индивидууму без введения кортикостероида индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов, по меньшей мере, за 12 часов, за 6-24 часа или за 12-24 часа до введения второй дозы. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят индивидууму за 1-2 часа, по меньшей мере, за 6 часов, по меньшей мере, за 12 часов, за 6-24 часа или за 12-24 часа до введения второй дозы. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов, по меньшей мере, за 12 часов, за 6-24

часа или 12-24 часа до введения второй дозы. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид представляет собой преднизон, кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон или преднизолон. В некоторых вариантах осуществления, более 0,5 мг/кг преднизона вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов (и необязательно, в течение 24 часов), по меньшей мере, за 12 часов (и необязательно, в течение 24 часов) или за 12-24 часа до введения второй дозы. В некоторых вариантах осуществления, 1 мг/кг преднизона вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов (и необязательно, в течение 24 часов), по меньшей мере, за 12 часов (и необязательно, в течение 24 часов) или за 12-24 часа до введения второй дозы. В некоторых вариантах осуществления, 80 мг преднизона вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов (и необязательно, в течение 24 часов), по меньшей мере, за 12 часов (и необязательно, в течение 24 часов) или за 12-24 часа до введения второй дозы. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводится индивидуумом самостоятельно. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят индивидууму перорально. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг во второй дозе. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от примерно 1 мг/кг до примерно 3 мг/кг во второй дозе. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве 1 мг/кг или 3 мг/кг во второй дозе. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве 1 мг/кг в первой дозе и в количестве 3 мг/кг во второй дозе. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве 3 мг/кг в первой дозе и в количестве 10 мг/кг во второй дозе. В некоторых вариантах осуществления, вторую дозу композиции вводят индивидууму внутривенно. В некоторых вариантах осуществления, вторую дозу композиции вводят индивидууму подкожно. В некоторых вариантах осуществления, способы дополнительно включают введение кортикостероида индивидууму за 1-2 часа до введения второй дозы. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид, вводимый индивидууму за 1-2 часа до введения второй дозы, представляет собой метилпреднизолон. В некоторых вариантах осуществления, 100 мг метилпреднизолона вводят индивидууму за 1-2 часа до введения второй дозы. В некоторых вариантах осуществления, способы дополнительно включают введение антигистаминного препарата индивидууму за 1-2 часа до введения второй дозы. В некоторых вариантах осуществления, 10 мг цетиризина вводят индивидууму за 1-2 часа до введения второй дозы. В некоторых вариантах осуществления, антигистаминный препарат вводят индивидууму перорально. В некоторых вариантах осуществления, способы дополнительно включают введение пациенту жаропонижающего или нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (NSAID) за 1-2 часа до введения второй дозы. В некоторых вариантах осуществления, жаропонижающее средство представляет собой ацетаминофен. В некоторых вариантах осуществления, 975-1000 мг

ацетаминофена вводят индивидууму за 1-2 часа до введения второй дозы. В некоторых вариантах осуществления, жаропонижающее или NSAID вводят индивидууму перорально.

В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, способы дополнительно включают введение индивидууму третьей дозы композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу вводят индивидууму примерно через 28 дней после второй дозы. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу вводят индивидууму примерно через 4 недели после второй дозы. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу вводят индивидууму примерно через 56 дней после первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу вводят индивидууму примерно через 8 недель после первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 2 часов до примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 часа до примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 2 часов. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 10 мл/час в течение 30 минут, 25 мл/час в течение 15 минут, 40 мл/час в течение 15 минут, 55 мл/час в течение 15 минут, 70 мл/час в течение 15 минут, 85 мл/час в течение 15 минут и 100 мл/час в течение 16 минут. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 3 часов. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 2 мл/час в течение 30 минут, 10 мл/час в течение 30 минут, 20 мл/час в течение 30 минут, 40 мл/час в течение 30 минут и 60 мл/час в течение 64 минут. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 1 мл/час в течение 15 минут, 5 мл/час в течение 15 минут, 10 мл/час в течение 30 минут, 15 мл/час в течение 30 минут, 25 мл/час в течение 30 минут, 30 мл/час в течение 30 минут, 35 мл/час в течение 30 минут и 40 мл/час в течение 62 минут. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 1 часа. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 24 мл/час в течение 15 минут и 125,3 мл/час в течение 45 минут. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу вводят индивидууму без введения кортикостероида индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов, по меньшей мере, за 12 часов, за 6-24 часа или за 12-24 часа до введения третьей дозы. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят

индивидууму за 1-2 часа, по меньшей мере, за 6 часов, по меньшей мере, за 12 часов, за 6-24 часа или за 12-24 часа до введения третьей дозы. В некоторых вариантах осуществления, способы включают: введение индивидууму первой дозы композиции в 1 день, где первую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов (необязательно, где кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы); введение индивидууму второй дозы композиции на 29 день (± 3 дня), где вторую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов; и введение индивидууму третьей дозы композиции на 57 день (± 3 дня), где третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 до примерно 4 часов, от примерно 2 до примерно 4 часов или в течение примерно любого из 1 часа, 2 часов или 4 часов (*например*, как описано в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, способы включают: введение индивидууму первой дозы композиции на 1 неделе, где первую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов (необязательно, где кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы); введение индивидууму второй дозы композиции на 4 неделе (± 3 дня), где вторую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов; и введение индивидууму третьей дозы композиции на 8 неделе (± 3 дня), где третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 до примерно 4 часов, от примерно 2 до примерно 4 часа или в течение примерно любого из 1 часа, 2 часов или 4 часов (*например*, как описано в настоящем документе).

В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, способы дополнительно включают введение индивидууму четвертой дозы композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления, четвертую дозу вводят индивидууму примерно через 28 дней после введения третьей дозы. В некоторых вариантах осуществления, четвертую дозу вводят индивидууму примерно через 4 недели после третьей дозы. В некоторых вариантах осуществления, четвертую дозу вводят индивидууму примерно через 56 дней после второй дозы. В некоторых вариантах осуществления, четвертую дозу вводят индивидууму примерно через 8 недель после второй дозы. В некоторых вариантах осуществления, четвертую дозу вводят индивидууму примерно через 84 дня после первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, четвертую дозу вводят индивидууму примерно через 12 недель после первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, четвертую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 2 часов до примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, четвертую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 часа до примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, четвертую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 2 часов. В некоторых вариантах

осуществления, четвертую дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 10 мл/час в течение 30 минут, 25 мл/час в течение 15 минут, 40 мл/час в течение 15 минут, 55 мл/час в течение 15 минут, 70 мл/час в течение 15 минут, 85 мл/час в течение 15 минут и 100 мл/час в течение 16 минут. В некоторых вариантах осуществления, четвертую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 3 часов. В некоторых вариантах осуществления, четвертую дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 2 мл/час в течение 30 минут, 10 мл/час в течение 30 минут, 20 мл/час в течение 30 минут, 40 мл/час в течение 30 минут и 60 мл/час в течение 64 минут. В некоторых вариантах осуществления, четвертую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, четвертую дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 1 мл/час в течение 15 минут, 5 мл/час в течение 15 минут, 10 мл/час в течение 30 минут, 15 мл/час в течение 30 минут, 25 мл/час в течение 30 минут, 30 мл/час в течение 30 минут, 35 мл/час в течение 30 минут и 40 мл/час в течение 62 минут. В некоторых вариантах осуществления, четвертую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 1 часа. В некоторых вариантах осуществления, четвертую дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 24 мл/час в течение 15 минут и 125,3 мл/час в течение 45 минут. В некоторых вариантах осуществления, способы включают: введение индивидууму первой дозы композиции в 1 день, где первую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов (необязательно, где кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы); введение индивидууму второй дозы композиции на 29 день (± 3 дня), где вторую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов; введение индивидууму третьей дозы композиции на 57 день (± 3 дня), где третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 до примерно 4 часов, от примерно 2 до примерно 4 часов или в течение примерно любого из 1 часа, 2 часов или 4 часов (*например*, как описано в настоящем документе); и введение индивидууму четвертой дозы композиции на 85 день (± 3 дня), где четвертую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 до примерно 4 часов, от примерно 2 до примерно 4 часа или в течение примерно любого из 1 часа, 2 часов или 4 часов (*например*, как описано в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, способы включают: введение индивидууму первой дозы композиции на 1 неделе, где первую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов (необязательно, где кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы); введение индивидууму второй дозы композиции на 4 неделе (± 3 дня), где вторую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4

часов; введение индивидууму третьей дозы композиции на 8 неделе (± 3 дня), где третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 до примерно 4 часов, от примерно 2 до примерно 4 часов или в течение примерно любого из 1 часа, 2 часов или 4 часов (*например*, как описано в настоящем документе); и введение индивидууму четвертой дозы композиции на 12-й неделе (± 3 дня), где четвертую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 до примерно 4 часов, от примерно 2 до примерно 4 часа или в течение примерно любого из 1 часа, 2 часов или 4 часов (*например*, как описано в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, способы включают: введение индивидууму первой дозы композиции в 1 день, где первую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов (необязательно, где кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы); введение индивидууму второй дозы композиции на 29 день (± 3 дня), где вторую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов; введение индивидууму третьей дозы композиции на 57 день (± 3 дня), где третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 до примерно 4 часов, от примерно 2 до примерно 4 часов или в течение примерно любого из 1 часа, 2 часов или 4 часов (*например*, как описано в настоящем документе); введение индивидууму четвертой дозы композиции на 85 день (± 3 дня), где четвертую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 до примерно 4 часов, от примерно 2 до примерно 4 часов или в течение примерно любого из 1 часа, 2 часов или 4 часов (*например*, как описано в настоящем документе); введение индивидууму пятой дозы композиции на 113 день (± 3 дня), где пятую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 до примерно 4 часов, от примерно 2 до примерно 4 часов или в течение примерно любого из 1 часа, 2 часов или 4 часов (*например*, как описано в настоящем документе); и введение индивидууму шестой дозы композиции на 141 день (± 3 дня), где шестую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 до примерно 4 часов, от примерно 2 до примерно 4 часа или в течение примерно любого из 1 часа, 2 часов или 4 часов (*например*, как описано в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, способы включают: введение индивидууму первой дозы композиции на 1 неделе, где первую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов (необязательно, где кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы); введение индивидууму второй дозы композиции на 4 неделе (± 3 дня), где вторую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов; введение индивидууму третьей дозы композиции на 8 неделе (± 3 дня), где третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 до примерно 4 часов, от примерно 2 до примерно 4 часов или в течение примерно любого из 1 часа, 2 часов или 4 часов (*например*, как описано в настоящем

документе); введение индивидууму четвертой дозы композиции на 12 неделе (± 3 дня), где четвертую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 до примерно 4 часов, от примерно 2 до примерно 4 часов или в течение примерно любого из 1 часа, 2 часов или 4 часов (*например*, как описано в настоящем документе); введение индивидууму пятой дозы композиции на 16 неделе (± 3 дня), где пятую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 до примерно 4 часов, от примерно 2 до примерно 4 часов или в течение примерно любого из 1 часа, 2 часов или 4 часов (*например*, как описано в настоящем документе); и введение индивидууму шестой дозы композиции на 20 неделе (± 3 дня), где шестую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 до примерно 4 часов, от примерно 2 до примерно 4 часа или в течение примерно любого из 1 часа, 2 часов или 4 часов (*например*, как описано в настоящем документе).

В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, у индивидуума диагностировано или было диагностировано заболевание или нарушение, характеризующееся одним или несколькими из следующих факторов: повышением активности эозинофилов, повышением активности тучных клеток, экспрессирующих Siglec-8, повышением эозинофилов и/или тучных клеток или повышенной активацией эозинофилов и/или тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума диагностировано или было диагностировано заболевание или нарушение, выбранное из группы, состоящей из: хронического риносинусита с сопутствующей астмой, аспирин-индуцированного респираторного заболевания, приобретенной не-атопической астмы с заболеванием носовых пазух, хронической обструктивной болезни легких, фиброзного заболевания, предфиброзного заболевания, распространенного системного мастоцитоза, вялотекущего системного мастоцитоза (ISM), воспалительного заболевания кишечника (IBD), эозинофильного эзофагита (EoE), эозинофильного гастрита (EG), эозинофильного гастроэнтерита (EGE), эозинофильного дуоденита, эозинофильного колита (EoC), тучноклеточного гастрита или тучноклеточного гастроэнтерита, гастрита или гастроэнтерита с повышенными тучными клетками, синдрома раздраженного кишечника с повышенными тучными клетками, функционального заболевания желудочно-кишечного тракта, аллергического конъюнктивита, гигантского папиллярного конъюнктивита, хронической крапивницы, аллергического бронхолегочного аспергиллеза (ABPA), аллергической астмы, астмы с эозинофильным или тучноклеточным фенотипом, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом (EGPA), глютеновой болезни, гастропареза, гиперэозинофильного синдрома, атопического дерматита, анафилаксии, ангионевротического отека, синдрома/нарушения активации тучных клеток и эозинофильного фасциита. В некоторых вариантах осуществления, способ по настоящему изобретению применяют для лечения индивидуума, у которого диагностировано или было диагностировано заболевание или нарушение, выбранное из группы, состоящей из:

хронического риносинусита с сопутствующей астмой, аспирин-индуцированного респираторного заболевания, приобретенной не атопической астмой с болезнью носовых пазух, хронической обструктивной болезни легких, фиброзной болезни, предфиброзной болезни, прогрессирующего системного мастоцитоза, вялотекущего системного мастоцитоза (ISM), воспалительного заболевания кишечника (IBD), эозинофильного эзофагита (ЕОЕ), эозинофильного гастрита (EG), эозинофильного гастроэнтерита (EGE), эозинофильного колита (ЭОК), эозинофильного дуоденита, тучноклеточного гастрита или тучноклеточного гастроэнтерита, гастрита или гастроэнтерита с повышенным уровнем тучных клеток, синдрома раздраженного кишечника с повышенным уровнем тучных клеток, функционального заболевания желудочно-кишечного тракта, аллергического конъюнктивита, гигантского папиллярного конъюнктивита, хронической крапивницы, аллергического бронхолегочного аспергиллеза (ABPA), аллергической астмы, астмы с эозинофильным или тучноклеточным фенотипом, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом (EGPA), глютеновой болезни, гастропареза, гиперэозинофильного синдрома, атопического дерматита, анафилаксии, ангионевротического отека, синдрома/нарушение активации тучных клеток и эозинофильного фасциита. В некоторых вариантах осуществления, индивидуумом является человек. В некоторых вариантах осуществления, перед введением композиции индивидуум потерпел неудачу при предшествующем лечении (*например*, стандартном лечении) одного или нескольких показаний, описанных выше (*например*, EG, EGE или ЕоЕ). В некоторых вариантах осуществления, перед введением композиции у индивидуума были симптомы заболевания, которые не контролировались должным образом предшествующим лечением (*например*, стандартным лечением) одного или нескольких показаний, описанных выше (*например*, EG, EGE или ЕоЕ). Неограничивающие примеры предшествующего лечения включают, среди прочего, ингибиторы протонной помпы (PPI), системные или местные кортикостероиды и/или диету.

В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, способы приводят к снижению количества эозинофилов по сравнению с количеством эозинофилов до введения композиции, *например*, в образце биопсии, полученном от индивидуума (для подсчета эозинофилов тканей), или периферической крови (для подсчета эозинофилов крови). Например, у человека может быть EG, EGE и/или ЕоЕ, и образец биопсии взят из слизистой оболочки желудка или двенадцатиперстной кишки. В некоторых вариантах осуществления, способы приводят к уменьшению количества эозинофилов в тканях, по меньшей мере, на 75%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85% или по меньшей мере, на 90% по сравнению с количеством эозинофилов в тканях до введения композиции, *например*, в образце биопсии (*например*, из пищевода, слизистой оболочки желудка или слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки), полученной от индивидуума с EG, EGE и/или ЕоЕ. В некоторых вариантах осуществления, способы приводят к уменьшению одного или нескольких симптомов у индивидуума по сравнению

с одним или несколькими симптомами у индивидуума до введения композиции (*например*, одного или нескольких из болей в животе, тошноты, диареи, рвоты, чувства сытости до окончания приема пищи, потери аппетита, спазмов в животе и вздутия живота у людей с EG, EGE и/или EoE). В некоторых вариантах осуществления, способы приводят к снижению, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 35%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 45%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 55%, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85% или по меньшей мере на 90% тяжести и/или частоты одного или нескольких симптомов у индивидуума по сравнению с одним или несколькими симптомами у индивидуума перед введением композиции (*например*, одного или нескольких из болей в животе, тошноты, диареи, рвоты, чувства сытости до окончания приема пищи, потери аппетита, спазмов в животе и вздутия живота у индивидуума с EG, EGE и/или EoE). В некоторых вариантах осуществления, способы приводят к частоте ответов, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60% или, по меньшей мере, 70%, *например*, у лиц с EG, EGE и/или EoE. В некоторых вариантах осуществления, частота ответа отражает долю индивидуумов со снижением количества эозинофилов в биопсии ткани и/или уменьшением симптомов по сравнению с состоянием до введения композиции. В некоторых вариантах осуществления, способы приводят к снижению, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 35%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 45% или по меньшей мере, на 50% тяжести дисфагии у индивидуума по сравнению с тяжестью дисфагии у индивидуума до введения композиции (*например*, у индивидуума с EG, EGE и/или EoE).

В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, антитело содержит Fc область и N-гликозид-связанные углеводные цепи, связанные с Fc областью, где менее 50% N-гликозид-связанных углеводных цепей антитела в композиции содержат фукозный остаток. В некоторых вариантах осуществления, по существу ни одна из N-гликозид-связанных углеводных цепей антитела в композиции не содержит фукозный остаток. В некоторых вариантах осуществления, антитело 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, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:66. В некоторых вариантах осуществления, 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 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 тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:11-14; и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:23-24. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:2-14; и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:16-24. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:2-10; и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:16-22. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит: (a) переменную 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) переменную 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, содержащую 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 некоторых вариантах осуществления, антитело содержит: (a) 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,

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, отличного от человека. В некоторых вариантах осуществления, примат, отличный от человека, представляет собой бабуина. 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, антитело представляет собой антитело человека, гуманизированное 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 является фукозилированной. 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 было сконструировано для улучшения активности антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит, по меньшей мере, одну аминокислотную замену в Fc области, которая улучшает активность ADCC. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна или две тяжелые цепи антитела являются не фукозилированными. 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, антитело представляет собой лирентелимаб. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления, композиция содержит антитело и фармацевтически приемлемый носитель.

Кроме того, в настоящем документе представлены наборы или изделия, содержащие лекарственное средство, содержащее композицию, содержащую антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, и листок-вкладыш, содержащий инструкции по введению лекарственного средства индивидууму, нуждающемуся в этом, в соответствии с любым из вышеуказанных 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 нижеследующем подробном описании.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

ФИГ. 1 показывает, что первичная конечная точка фазы 2 исследования, изучающего лечение пациентов с EG и/или EGE с использованием анти-Siglec-8 антитела, была достигнута для всех групп лечения.

ФИГ. 2 показывает, что вторичная конечная точка шкалы общей оценки симптомов (TSS) фазы 2 исследования была достигнута для всех групп лечения.

ФИГ. 3 показывает улучшение всех симптомов, измеренное при лечении анти-Siglec-8 антителом.

ФИГ. 4 показывает, что вторичная конечная точка отвечающего фазы 2 исследования была достигнута для всех групп лечения. Ответ на лечение определяли как >75% снижение количества эозинофилов в биопсии ткани и >30% уменьшение симптомов (TSS) на 13-14 неделе.

ФИГ. 5 показывает значительное снижение эозинофилов у пациентов с эозинофильным эзофагитом (ЕоЕ).

ФИГ. 6 показывает значительное уменьшение дисфагии у пациентов с ЕоЕ.

ФИГ. 7 показывает результаты безопасности фазы 2 исследования. Следует отметить, что более чем у 61% пациентов, получавших лечение анти-Siglec-8 антителом, наблюдалась инфузионная реакция (IRR) по сравнению с 23% пациентов, получавших плацебо. Однако 95% IRR были легкой или средней степени тяжести, и никаких других значительных нежелательных явлений (АЕ) не наблюдалось.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

I. Определения

Следует понимать, что настоящее описание не ограничивается конкретными композициями или биологическими системами, которые, конечно, могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения. Используемые в этом описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа «a», «an» и «the» включают ссылки на множественное число, если содержание явно не диктует иное. Так, например, ссылка на «молекулу» необязательно, включает комбинацию двух или нескольких таких молекул и подобное.

Термин «примерно» относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, хорошо известному специалисту в данной области техники. Ссылка на «примерно» значения или параметра в настоящем документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на это значение или параметр как таковой.

Понятно, что аспекты и варианты осуществления настоящего описания включают «содержащие», «состоящие» и «по существу состоящие из» аспектов и вариантов осуществления.

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

Основная 4-цепочечная единица антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. IgM-антитела состоят из 5 основных гетеротетрамерных звеньев

вместе с дополнительным полипептидом, называемым J цепью, и содержат 10 антигенсвязывающих сайтов, в то время как IgA антитела содержат от 2 до 5 основных 4-цепочечных звеньев, которые могут полимеризоваться с образованием поливалентных сборок в комбинации с цепью J. В случае IgG, 4-цепочечная единица обычно составляет примерно 150000 дальтон. Каждая L цепь связана с H цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда 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_H), за которым следуют три константных домена (C_H) для каждой из α и γ цепей, и четыре C_H домена для изоформ μ и ϵ . Каждая L цепь имеет на N-конце переменный домен (V_L), за которым следует константный домен на другом конце. V_L выравниваются с V_H , и C_L выравниваются с первым константным доменом тяжелой цепи (C_H1). Считается, что конкретные аминокислотные остатки образуют интерфейс между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи. Спаривание V_H и V_L вместе образует единый антигенсвязывающий сайт. Касательно структуры и свойств 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, стр. 71 и глава 6.

L цепь любого вида позвоночных может быть отнесена к одному из двух четко различающихся типов, называемых каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей (C_H), иммуноглобулины могут быть отнесены к разным классам или изоформам. Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, тяжелые цепи которых обозначены α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Классы γ и α дополнительно подразделяются на подклассы на основании относительно незначительных различий в последовательности и функции C_H , *например*, у людей экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Антитела IgG1 могут существовать в виде нескольких полиморфных вариантов, называемых аллотипами (обсуждается в Jefferis and Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4 1-7), любой из которых подходит для использования в настоящем изобретении. Распространенными аллотипическими вариантами в человеческих популяциях являются такие, которые обозначаются буквами a, f, n, z.

«Выделенное» антитело представляет собой антитело, которое было идентифицировано, выделено и/или восстановлено из компонента среды его продуцирования (*например*, естественно или рекомбинантно). В некоторых вариантах осуществления, выделенный полипептид не связан со всеми другими компонентами среды его продуцирования. Загрязняющие компоненты среды его продуцирования, такие как продукты рекомбинантных трансфицированных клеток, представляют собой материалы, которые обычно мешают исследовательскому, диагностическому 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% масс. антитела, по данным, например, способа Лоури, и в некоторых вариантах осуществления, до более чем 99% масс.; (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 по SDS-PAGE в не восстанавливающих или восстанавливающих условиях с использованием окрашивания Coomassie синим или серебряным. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку, по меньшей мере, один компонент естественного окружения антитела не будет присутствовать. Обычно, однако, выделенный полипептид или антитело получают с помощью, по меньшей мере, одной стадии очистки.

Термин «моноклональное антитело», используемый в настоящем документе, относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, *т.е.* отдельные антитела, входящие в популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций и/или посттрансляционных модификаций (*например*, изомеризаций, амидирований), которые могут присутствовать в незначительных количествах. В некоторых вариантах осуществления, моноклональные антитела имеют C-концевое расщепление на тяжелой цепи и/или легкой цепи. Например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков расщепляются на C-конце тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления, C-концевое расщепление удаляет C-концевой лизин из тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления, моноклональные антитела имеют N-концевое расщепление на тяжелой цепи и/или легкой цепи. Например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков расщепляются на N-конце тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления, 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 «моноклональный» указывает на то, что антитело получено из по существу гомогенной популяции антител, и его не следует толковать как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим описанием, могут быть получены различными методами, включая, например, гибридомный метод, методы рекомбинантной ДНК, технологии фагового дисплея и технологии получения антител человека или человекоподобных у животных, которые имеют части или все локусы иммуноглобулинов человека или гены, кодирующие последовательности иммуноглобулинов человека.

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

Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» или «полное антитело» используются взаимозаменяемо для обозначения антитела в его практически

интактной форме, в отличие от фрагмента антитела. В частности, полные антитела включают антитела с тяжелыми и легкими цепями, включая Fc область. Константные домены могут представлять собой константные домены нативной последовательности (*например*, константные домены нативной последовательности человека) или варианты их аминокислотной последовательности. В некоторых случаях, интактное антитело может иметь одну или несколько эффекторных функций.

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

Папаиновый перевар папаином дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых «Fab» фрагментами, и остаточный «Fc» фрагмент, обозначение которого отражает способность легко кристаллизоваться. Fab фрагмент состоит из целой L цепи вместе с доменом переменной области H цепи (V_H) и первым константным доменом одной тяжелой цепи (C_{H1}). Каждый Fab фрагмент является моновалентным в отношении связывания антигена, *т.е.* он имеет единственный антигенсвязывающий сайт. Обработка антитела пепсином дает один большой фрагмент F(ab')₂, который примерно соответствует двум Fab фрагментам, связанным дисульфидом, обладающим разной антигенсвязывающей активностью и все еще способным к перекрестному связыванию антигена. Fab' фрагменты отличаются от Fab фрагментов наличием нескольких дополнительных остатков на карбокси конце домена C_{H1}, включая один или несколько цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH представляет собой обозначение для Fab', в котором цистеиновый остаток(и) константных доменов несет свободную тиольную группу. Фрагменты F(ab')₂ антитела первоначально были получены в виде пар Fab' фрагментов, между которыми имеются шарнирные цистеины. Также известны другие химические сочетания фрагментов антител.

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

«Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный сайт распознавания и связывания антигена. Этот фрагмент состоит из димера домена переменной области одной тяжелой и одной легкой цепи в тесной не ковалентной ассоциации. В результате укладки этих двух доменов образуются шесть гиперпеременной петель (по 3 петли в каждой из H и L цепей), которые вносят аминокислотные остатки для связывания антигена и придают антителу антигенсвязывающую специфичность. Однако даже один переменный домен (или половина Fv, содержащая только три HVR, специфичных к антигену) обладает

способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низкой аффинностью, чем весь сайт связывания.

«Одноцепочечные Fv», также сокращенно обозначаемые как «sFv» или «scFv», представляют собой фрагменты антител, которые содержат домены V_H и V_L антитела, соединенные в одну полипептидную цепь. В некоторых вариантах осуществления, sFv полипептид дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L, который позволяет sFv образовывать желаемую структуру для связывания антигена. Обзор sFv см. в 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 описанию включают часть интактного антитела, обычно включающую антигенсвязывающую или вариабельную область интактного антитела или Fv область антитела, которая сохраняет или имеет модифицированную способность связывания FcR. Примеры фрагментов антител включают линейные антитела, молекулы одноцепочечного антитела и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Моноклональные антитела в настоящем документе конкретно 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 антител, происходящих от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагментов таких антител, если они проявляют желаемую биологическую активность (патент США № 4,816,567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Представляющие интерес химерные антитела включают антитела PRIMATIZED®, в которых антигенсвязывающая область антитела получена из антитела, полученного, *например*, путем иммунизации макака представляющим интерес антигеном. Используемый в настоящем документе термин «гуманизованное антитело» используется как подмножество «химерных антител».

«Гуманизованные» формы не человеческих (*например*, мыши) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из не человеческого иммуноглобулина. В одном варианте осуществления, гуманизованное антитело представляет собой иммуноглобулин человека (реципиентное антитело), в котором остатки из HVR реципиента заменены остатками из HVR вида, отличного от человека (донорное антитело), такого как мышь, крыса, кролик или примат, отличный от человека, обладающий желаемой специфичностью, аффинностью и/или способностью. В некоторых случаях, FR остатки иммуноглобулина человека заменены соответствующими не человеческими остатками. Кроме того, гуманизованные антитела могут содержать остатки, которых нет в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти

модификации могут быть сделаны для дальнейшего улучшения характеристик антител, таких как аффинность связывания. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из, по меньшей мере, одного, и обычно, двух переменных доменов, в которых все или по существу все гиперпеременные петли соответствуют петлям последовательности не человеческого иммуноглобулина, и все или по существу все FR области представляют собой области последовательности иммуноглобулина человека, хотя FR области могут включать одну или несколько замен отдельных остатков FR, 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 и не более 3 в L цепи. Гуманизированное антитело необязательно, также будет содержать, по меньшей мере, часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Более подробно 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); Hurler 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 аминокислотным доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи могут обозначаться как «VH» и «VL» соответственно. Эти домены обычно являются наиболее переменными частями антитела (относительно других антител того же класса) и содержат антигенсвязывающие сайты.

Термин «гиперпеременная область», «HVR» или «HV», используемый в настоящем документе, относится к областям переменного домена антитела, которые являются гиперпеременными по последовательности и/или образуют структурно определенные петли. Как правило, антитела включают 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, в частности, считается, что H3 играет уникальную роль в придании тонкой 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 верблюдовых, 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).

Используется ряд трансдифференцировок HVR, которые включены в настоящее описание. HVR, которые представляют собой определяющие комплементарность области

(CDR) по Kabat, основаны на вариабельности последовательности и являются наиболее часто используемыми (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). HVR по Chothia напротив относятся к расположению структурных петель (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). «Контактные» HVR основаны на анализе доступных сложных кристаллических структур. Остатки от каждого 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 Kabat)
H1	H31-H35	H26-H32	H30-H35	(нумерация Chothia)
H2	H50-H65	H53-H56	H47-H58	
H3	H95-H102	H95-H102	H93-H101	

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

«Каркасные» или «FR» остатки представляют собой остатки вариабельного домена, отличные от остатков HVR, как определено в настоящем документе.

Выражение «нумерация остатков вариабельного домена как в Kabat» или «нумерация положений аминокислот как в Kabat» и их варианты относятся к системе нумерации, используемой для вариабельных доменов тяжелой цепи или вариабельных доменов легкой цепи компиляция антител из Kabat et al., см. *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 вариабельного домена. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может включать вставку одной аминокислоты (остаток 52a по Kabat) после остатка 52 из H2 и вставленные остатки (*например*, остатки 82a, 82b и 82c и *т.д.* по Kabat) после остатка 82 тяжелой цепи FR. Нумерация остатков по Kabat может быть определена для данного антитела путем выравнивания областей гомологии последовательности антитела со «стандартной» последовательностью, пронумерованной по Kabat.

«Акцепторный каркас человека» для целей настоящего документа представляет собой каркас, содержащий аминокислотную последовательность каркаса VL или VH, полученного из каркаса иммуноглобулина человека или консенсусного каркаса человека. Акцепторный каркас человека, «полученный из» каркаса иммуноглобулина человека или консенсусного каркаса человека, может содержать ту же аминокислотную последовательность, или он может содержать ранее существовавшие изменения аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, количество ранее существовавших аминокислотных замен составляет 10 или менее, 9 или менее, 8

или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее.

«Доля (%) идентичности аминокислотной последовательности» по отношению к эталонной последовательности полипептида определяется как процентная доля аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если это необходимо, для достижения максимальной доли идентичности последовательности и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание с целью определения доли идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, известными специалистам в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как 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 относительно данной аминокислотной последовательности В (которая может быть альтернативно названа данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или содержит определенный% идентичности аминокислотной последовательности к, с или против данной аминокислотной последовательности В) рассчитывается следующим образом:

$100 \text{ умножить на дробь } X/Y$

где X представляет собой количество аминокислотных остатков, признанных идентичными последовательности при выравнивании А и В этой программой, и где Y представляет собой общее количество аминокислотных остатков в В. Следует понимать, что если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, % идентичности аминокислотных последовательностей А и В не будет равен% идентичности аминокислотных последовательностей В и А.

Антитело, которое «связывается», «специфически связывается» или является «специфическим для» определенного полипептида или эпитопа на конкретном полипептиде, представляет собой антитело, которое связывается с этим конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде, по существу не связываясь с каким-либо другим полипептидом или полипептидным эпитопом. В некоторых вариантах осуществления, связывание анти-Siglec-8 антитела, описанного в настоящем документе (*например*, антитела, которое связывается с Siglec-8 человека) с не родственным полипептидом, не относящимся к Siglec-8, составляет менее примерно 10% от связывания антитела с Siglec-8, по данным способов, известных в данной области техники (*например*, твердофазного 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) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,7$ нМ, $\leq 0,6$ нМ, $\leq 0,5$ нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М).

Термин «анти-Siglec-8 антитело» или «антитело, которое связывается с Siglec-8 человека» относится к антителу, которое связывается с полипептидом или эпитопом Siglec-8 человека по существу без связывания с каким-либо другим полипептидом или эпитопом не родственного не-Siglec-8 полипептида.

Термин «Siglec-8», используемый в настоящем документе, относится к белку Siglec-8 человека. Термин также включает встречающиеся в природе варианты Siglec-8, в том числе варианты сплайсинга или аллельные варианты. Аминокислотная последовательность типового Siglec-8 человека показана в SEQ ID NO:72. Аминокислотная последовательность другого типового Siglec-8 человека показана 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 аминокислотную последовательность Fc области слитого белка Siglec-8 Fc.

Аминокислотная последовательность Siglec-8 человека

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSPYQDGWTDSDPVHGYWFRAGDRPYQDAP
VATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIEWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGS MKWSYK
SQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHSRNLTCVWPWACKQGTPPMISWIGASV
SSPGPTTARSSVLTLPKPDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPWNLTMTVFQ
GDATASTALGNSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELP
RVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFL
SFCIIFIVRSCRKKSARPAAGVGDGMEDAKAIRGSASQGPLTESWKDGNPLKPPPAV
APSSGEEGELHYATLSFHKVKPDQPQGQEATDSEYSEIKHKRETAETQAACLRNHNPSK
EVRG (SEQ ID NO:72)

Аминокислотная последовательность Siglec-8 человека

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSPYQDGWTDSDPVHGYWFRAGDRPYQDAP
VATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIEWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGS MKWSYK
SQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHPRNLTCVWPWACKQGTPPMISWIGASV
SSPGPTTARSSVLTLPKPDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPWNLTMTVFQ
GDATASTALGNSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELP
RVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFL
SFCIIFIVRSCRKKSARPAAGVGDGMEDAKAIRGSASQGPLTESWKDGNPLKPPPAV
APSSGEEGELHYATLSFHKVKPDQPQGQEATDSEYSEIKHKRETAETQAACLRNHNPSK
EVRG (SEQ ID NO:73)

Аминокислотная последовательность слитого белка Siglec-8 Fc

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPSCFSYPQDGWTDSDPVGHWFRAGDRPYQDAP
 VATNNDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSIRDARKRDKGYSFFRLERGS MKWSYK
 SQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHSRNLTCVWPWACKQGTTPMISWIGASV
 SSPGPTTARSSVLTLPKPKQDHGTSLTCQVTLPGTGVTTTSTVRLDVSYPPWNLTMTVFQ
 GDATASTALGNSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELP
 RVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGIEGRSDKTH
TCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:74)

Антитела, которые «индуцируют апоптоз» или являются «апоптозными», представляют собой такие антитела, которые вызывают запрограммированную гибель клеток по данным стандартных анализов апоптоза, таких как связывание аннексина V, фрагментация ДНК, сжатие клеток, расширение эндоплазматического ретикулума, фрагментация клеток и/или образование мембранных везикул (называемых апоптозными тельцами). Например, апоптотическая активность анти-Siglec-8 антител (*например*, антитела, которое связывается с Siglec-8 человека) по настоящему изобретению может быть продемонстрирована путем окрашивания клеток аннексином V.

«Эффекторные функции» антитела относятся к той биологической активности, которая вызывается Fc областью (нативной последовательности Fc области или вариантной аминокислотной последовательности Fc области) антитела и варьируется в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антител включают: связывание C1q и комплемент-зависимую цитотоксичность; связывание Fc рецептора; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; угнетающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (*например*, рецепторов В-клеток); и активацию В-клеток.

«Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «ADCC» относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig, связанный с Fc рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (*например*, естественных киллерах (NK), нейтрофилах и макрофагах), позволяет таким цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с несущей антиген клеткой-мишенью и впоследствии убивать клетку-мишень цитотоксинами. Антитела «вооружают» цитотоксические клетки и необходимы для уничтожения клетки-мишени по этому механизму. 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 странице 464 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 ADCC активность представляющей интерес молекулы, может быть проведен анализ ADCC in

in vitro, такой как описан в патенте 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 представляющей интерес молекулы может быть оценена in vivo, например, на животной модели, такой как описана Clynes et al., PNAS USA 95:652-656 (1998). Другие варианты Fc, которые изменяют активность ADCC и другие свойства антител, включают варианты, описанные 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; Патенты 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 документе используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая Fc области с нативной последовательностью и варианты Fc области. Хотя границы Fc области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, Fc область тяжелой цепи IgG человека обычно определяют как простирающуюся от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до его карбокси-конца. Подходящие Fc области с нативной последовательностью для использования в антителах по настоящему изобретению включают IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека. Одиночная аминокислотная замена (S228P по нумерации Kabat; обозначенная как IgG4Pro) может быть введена для устранения гетерогенности, наблюдаемой в рекомбинантном антителе IgG4. Angal, S. et al. (1993) Mol Immunol 30, 105-108.

«Не фукозилированное» или «фукоза-дефицитное» антитело относится к гликозилированному варианту антитела, содержащему Fc область, в котором углеводная структура, присоединенная к Fc области, имеет уменьшенное количество фукозы или не содержит фукозы. В некоторых вариантах осуществления, антитело с пониженным содержанием фукозы или не содержащее фукозы обладает улучшенной функцией ADCC. Не фукозилированные или фукоза-дефицитные антитела имеют пониженное содержание фукозы по сравнению с количеством фукозы на том же антителе, продуцируемом в клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления, рассматриваемая в настоящем документе композиция не фукозилированного или фукоза-дефицитного антитела представляет собой композицию, в которой менее примерно 50% N-связанных гликанов,

присоединенных к Fc области антител в композиции, содержат фукозу.

Термины «фукозилирование» или «фукозилированный» относятся к присутствию фукозных остатков в составе олигосахаридов, присоединенных к пептидному остову антитела. В частности, фукозилированное антитело содержит α -(1,6)-связанную фукозу на самом внутреннем N-ацетилглюкозаминовом остатке (GlcNAc) в одном или обоих N-связанных олигосахаридах, присоединенных к Fc области антитела, например, в положении Asn 297 Fc домена IgG1 человека (EU нумерация остатков Fc области). Asn297 также может быть расположен примерно на +3 аминокислоты выше или ниже положения 297, т.е. между положениями 294 и 300, из-за незначительных вариаций последовательности иммуноглобулинов.

«Степень фукозилирования» представляет собой долю содержания фукозилированных олигосахаридов относительно всех олигосахаридов, идентифицированных способами, известными в данной области техники, *например*, в композиции антитела, обработанной N-гликозидазой F, оцениваемой с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF MS). В композиции «полностью фукозилированного антитела» по существу все олигосахариды содержат фукозные остатки, *т.е.* являются фукозилированными. В некоторых вариантах осуществления, композиция полностью фукозилированного антитела имеет степень фукозилирования, по меньшей мере, примерно 90%. Соответственно, отдельное антитело в такой композиции обычно содержит фукозные остатки в каждом из двух N-связанных олигосахаридов в Fc области. Наоборот, в композиции «полностью не фукозилированного» антитела по существу ни один из олигосахаридов не является фукозилированным, и отдельное антитело в такой композиции не содержит фукозных остатков ни в одном из двух N-связанных олигосахаридов в Fc области. В некоторых вариантах осуществления, композиция полностью не фукозилированного антитела имеет степень фукозилирования менее 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 в обоих N-связанных олигосахаридах в Fc области, при условии, что композиция не содержит по существу все отдельные антитела, в которых отсутствуют фукозные остатки в N-связанных олигосахаридах в Fc области, а также 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», как используется в настоящем документе, 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 с Siglec-8 (который может представлять собой димер, такой как слитый белок Siglec-8-Fc, описанный в настоящем документе) обычно может быть представлена константой диссоциации (K_d). Аффинность можно измерить обычными способами, известными в данной области техники, включая описанные в настоящем документе.

«Авидность связывания», как используется в настоящем документе, 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, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая идентифицирована и отделена от, по меньшей мере, одной загрязняющей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в среде, в которой она была получена. В некоторых вариантах осуществления, выделенная нуклеиновая кислота не связана со всеми компонентами, связанными с продуцирующей средой. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды и антитела в настоящем документе, находятся в форме, отличной от формы или условий, в которых они встречаются в природе. Таким образом, выделенные молекулы нуклеиновой кислоты отличаются от нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды и антитела в настоящем документе, существующие в природе в клетках.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности активного ингредиента, и которая не содержит дополнительных компонентов, являющихся неприемлемо токсичными для индивидуума, которому будет вводиться состав. Такие составы являются стерильными.

«Носители», используемые в настоящем документе, включают фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы, которые нетоксичны для клетки или млекопитающего, подвергающихся их воздействию в используемых дозировках и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представляет собой водный раствор с pH-буфером. Примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярный (менее примерно 10 остатков) полипептид; 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 развития

индивидуума или клетки, подвергаемой лечению, в ходе развития клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают снижение скорости прогрессирования заболевания, облегчение или смягчение болезненного состояния, ремиссию или улучшение прогноза. Индивидуум успешно «лечится», например, если один или несколько симптомов, связанных с заболеванием, смягчаются или устраняются. Например, индивидуум успешно «лечится», если лечение приводит к повышению качества жизни страдающих от заболевания, снижению дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, уменьшению частоты рецидивов заболевания, уменьшению тяжести заболевания, задержке развития или прогрессирования заболевания и/или продлению выживаемости индивидуумов.

Используемый в настоящем документе термин «в сочетании с» или «в комбинации с» относится к применению одного лечебного воздействия в дополнение к другому лечебному воздействию. Таким образом, «в сочетании с» или «в комбинации с» относится к применению одного лечебного воздействия до, во время или после применения другого лечебного воздействия к индивидууму.

Используемый в настоящем документе термин «профилактика» или «предотвращать» включает обеспечение профилактики в отношении возникновения или рецидива заболевания у индивидуума. Индивидуум может быть предрасположен к заболеванию, восприимчив к заболеванию или подвергаться риску развития заболевания, но у него еще не 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.

Как используется в настоящем документе, индивидуум, «подверженный риску» развития заболевания, может иметь или не иметь обнаруживаемое заболевание или симптомы заболевания, и может проявлять или не проявлять обнаруживаемое заболевание или симптомы заболевания до применения способов лечения, описанных в настоящем документе. «Подверженный риску» означает наличие у индивидуума одного или нескольких факторов риска, которые представляют собой измеримые параметры, коррелирующие с развитием заболевания, как известно в данной области техники. У человека, имеющего один или несколько из этих факторов риска, вероятность развития заболевания выше, чем у человека без одного или нескольких из этих факторов риска.

«Эффективное количество» относится, по меньшей мере, к 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 обеспечено за одно или несколько введений. «Терапевтически эффективное количество» представляет собой, по меньшей мере, минимальную концентрацию, необходимую для осуществления измеримого улучшения конкретного заболевания. Терапевтически эффективное количество в настоящем документе может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и вес пациента, и способность антитела вызывать

желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективным количеством также может быть такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты антитела перевешиваются терапевтически полезными эффектами. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата. Как правило, но не обязательно, поскольку профилактическая доза используется у индивидуумов до или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество может быть меньше, чем терапевтически эффективное количество.

«Постоянное» введение относится к введению лекарственного средства (лекарственных средств) в непрерывном, а не остром режиме, чтобы поддерживать первоначальный терапевтический эффект (активность) в течение продолжительного периода времени. «Периодическое» введение представляет собой лечение, которое не проводится последовательно без перерыва, а скорее носит циклический характер.

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

Используемый в настоящем документе термин «индивидуум» или «субъект» представляет собой млекопитающее. «Млекопитающие» для целей лечения включают людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных зоопарка, спортивных или домашних животных, таких как собаки, лошади, кролики, крупный рогатый скот, свиньи, хомяки, песчанки, мыши, хорьки, крысы, кошки и *т. д.* В некоторых вариантах осуществления, индивидуум или субъект представляет собой человека.

II. Способы

В настоящем документе представлены способ введения композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, индивидууму, где кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы композиции (*например*, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека). В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение индивидууму кортикостероида, затем введение индивидууму первой дозы композиции (*например*, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), по меньшей мере, через 6 часов после введения кортикостероида. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 12 часов до введения композиции. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят индивидууму в течение 24 часов до введения композиции, *например*, за 6-24 часа или за 12-24 часа. Не желая быть связанными теорией, считается, что введение кортикостероидов может помочь уменьшить риск и/или тяжесть IRR, связанных с введением анти-Siglec-8 антитела. В некоторых вариантах осуществления, индивидуумом является человек.

В настоящем документе представлены способы введения композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, индивидууму, где первую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы композиции (*например*, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека). В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение индивидууму кортикостероида, затем введение индивидууму первой дозы композиции (*например*, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека), по меньшей мере, через 6 часов после введения кортикостероида, где первую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов. Не желая быть связанными теорией, считается, что более длительное время инфузии и/или более низкая скорость инфузии для первой дозы могут помочь снизить риск и/или тяжесть IRR, связанных с введением анти-Siglec-8 антитела. В некоторых вариантах осуществления, индивидуумом является человек.

В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид представляет собой преднизон. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид представляет собой метилпреднизолон, гидрокортизон или дексаметазон. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид представляет собой преднизон, кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон или преднизолон. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводится самостоятельно индивидуумом, которого лечат анти-Siglec-8 антителом. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят перорально.

В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид (*например*, преднизон) вводят в дозе более 0,5 мг/кг или примерно 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид (*например*, преднизон) вводят в дозе 80 мг. Например, в некоторых вариантах осуществления, способы включают введение индивидууму более 0,5 мг/кг преднизона, по меньшей мере, в течение 6 часов (и необязательно, в течение 24 часов), по меньшей мере, 12 часов (и необязательно, в течение 24 часов), за 6-24 часов, или за 12-24 часа до введения первой дозы анти-Siglec-8 антитела. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение индивидууму от 0,5 мг/кг до 1 мг/кг преднизона в течение, по меньшей мере, 6 часов (и необязательно, в течение 24 часов), по меньшей мере, 12 часов (и необязательно, в течение 24 часов), за 6-24 часов или за 12-24 часа до введения первой дозы анти-Siglec-8 антитела. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение индивидууму 1 мг/кг преднизона, по меньшей мере за 6 часов (и необязательно, в течение 24 часов), по меньшей мере за 12 часов (и необязательно, в течение 24 часов), за 6-24 часа или за 12-24 часа до введения первой дозы анти-Siglec-8 антитела. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение индивидууму 60 мг или 80 мг преднизона, по меньшей мере, за 6 часов (и необязательно, в течение 24 часов), по меньшей мере, за 12 часов (и необязательно, в течение 24 часов), за 6-24 часа или за 12-24 часа до введения первой дозы

анти-Siglec-8 антитела.

В некоторых вариантах осуществления, введение кортикостероида, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы снижает риск инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением первой дозы без введения кортикостероида, по меньшей мере, за 6 часов. В некоторых вариантах осуществления, введение кортикостероида, по меньшей мере, за 12 часов до введения первой дозы снижает риск инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением первой дозы без введения кортикостероида по меньшей мере, за 12 часов. В некоторых вариантах осуществления, введение кортикостероида за 12-24 часа до введения первой дозы снижает риск инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением первой дозы без введения кортикостероида за 12-24 часа. В некоторых вариантах осуществления, введение кортикостероида, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы снижает тяжесть инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением первой дозы без введения кортикостероида по меньшей мере, за 6 часов. В некоторых вариантах осуществления, введение кортикостероида, по меньшей мере, за 12 часов до введения первой дозы снижает тяжесть инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением первой дозы без введения кортикостероида по меньшей мере, за 12 часов. В некоторых вариантах осуществления, введение кортикостероида за 12-24 часа до введения первой дозы снижает тяжесть инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением первой дозы без введения кортикостероида за 12-24 часа.

В некоторых вариантах осуществления, первую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, менее 50% от общего объема первой дозы вводят индивидууму в первые 2 часа инфузии. В некоторых вариантах осуществления, менее 30% от общего объема первой дозы вводят индивидууму в первые 2 часа инфузии. В некоторых вариантах осуществления, первую дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 1 мл/час в течение 15 минут, 5 мл/час в течение 15 минут, 10 мл/час в течение 30 минут, 15 мл/час в течение 30 минут, 25 мл/час в течение 30 минут, 30 мл/час в течение 30 минут, 35 мл/час в течение 30 минут и 40 мл/час в течение 62 минут. В некоторых вариантах осуществления, первую дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со схемой, показанной в Таблице А.

Таблица А. Схема скорости инфузии для 4-часовой инфузии.

Скорость инфузии (мл/ч)	Длительность скорости инфузии (минуты)	Суммарное время инфузии (ч:мин)	Вводимый объем (мл)	Суммарный введенный объем (мл)
1	15	00:15	0,25	0,25
5	15	00:30	1,25	1,5

10	30	01:00	5	6,5
15	30	01:30	7,5	14
25	30	2:00	12,5	26,5
30	30	2:30	15	41,5
35	30	3:00	17,5	59
40	62	4:02	41	100

В некоторых вариантах осуществления, введение первой дозы композиции внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов снижает риск инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением первой дозы внутривенной инфузией в течение менее 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, введение первой дозы композиции внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов снижает тяжесть инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением первой дозы внутривенной инфузией в течение менее 4 часов.

В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в первой дозе от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в первой дозе от 1 мг/кг до 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в первой дозе от 0,1 мг/кг до 3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в первой дозе от 0,1 мг/кг до 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в первой дозе от примерно 1 мг/кг до примерно 3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в первой дозе 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в первой дозе 3 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в первой дозе примерно 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,5 мг/кг, 4,0 мг/кг, 4,5 мг/кг, 5,0 мг/кг, 5,5 мг/кг, 6,0 мг/кг, 6,5 мг/кг, 7,0 мг/кг, 7,5 мг/кг, 8,0 мг/кг, 8,5 мг/кг, 9,0 мг/кг, 9,5 мг/кг или 10,0 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в первой дозе внутривенным или подкожным путем.

В некоторых вариантах осуществления, способы дополнительно включают введение кортикостероида индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы. То есть способы могут включать введение кортикостероида, по меньшей мере, за 6 часов (и необязательно, в течение 24 часов), по меньшей мере, за 12 часов (и необязательно, в течение 24 часов), за 6-24 часа или за 12-24 часа до введения первой дозы, а также введение кортикостероида в течение 1 часа, примерно 1 часа, в течение 2 часов, примерно 2 часов или 1-2 часов до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид представляет собой преднизон. В некоторых вариантах осуществления,

кортикостероид представляет собой метилпреднизолон. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид представляет собой гидрокортизон или дексаметазон. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид (*например*, преднизон) вводят в дозе более 0,5 мг/кг в течение 1 часа, примерно 1 часа, в течение 2 часов, примерно 2 часов или за 1-2 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид (*например*, преднизон) вводят в дозе примерно 1 мг/кг в течение 1 часа, примерно 1 часа, в течение 2 часов, примерно 2 часов или за 1-2 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид (*например*, преднизон) вводят в дозе 80 мг в течение 1 часа, примерно 1 часа, в течение 2 часов, примерно 2 часов или за 1-2 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид (*например*, метилпреднизолон) вводят в дозе 100 мг в течение 1 часа, примерно 1 часа, в течение 2 часов, примерно 2 часов или за 1-2 часа до введения первой дозы.

В некоторых вариантах осуществления, способы дополнительно включают введение антигистаминного препарата индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, способы могут включать введение антигистаминного препарата в течение 1 часа, примерно 1 часа, в течение 2 часов, примерно 2 часов или за 1-2 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, антигистаминный препарат представляет собой цетиризин. В некоторых вариантах осуществления, антигистаминный препарат вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления, антигистаминный препарат (*например*, цетиризин) вводят в дозе 10 мг в течение 1 часа, примерно 1 часа, в течение 2 часов, примерно 2 часов или за 1-2 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, антигистаминный препарат (*например*, цетиризин) вводят в дозе 10 мг за 40 минут - 180 минут до введения первой дозы.

В некоторых вариантах осуществления, способы дополнительно включают введение пациенту жаропонижающего или нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (NSAID) за 1-2 часа до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, способы могут включать введение жаропонижающего средства или NSAID в течение 1 часа, примерно 1 часа, в течение 2 часов, примерно 2 часов или 1-2 часов до введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, жаропонижающее или NSAID представляет собой ацетаминофен. В некоторых вариантах осуществления, жаропонижающее или NSAID вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления, жаропонижающее или NSAID (*например*, ацетаминофен) вводят в дозе 975-1000 мг в течение 1 часа, примерно 1 часа, в течение 2 часов, примерно 2 часов или за 1-2 часа до введения первой дозы.

В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, способы дополнительно включают введение индивидууму второй дозы композиции, содержащей антитело, которое

связывается с Siglec-8 человека. Например, вторую дозу можно вводить примерно через 28 дней, примерно через 4 недели или примерно через 1 месяц после введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, вторую дозу вводят индивидууму без введения кортикостероида индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов, по меньшей мере, за 12 часов, за 6-24 часа или за 12-24 часа до введения второй дозы. То есть в некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов, по меньшей мере, за 12 часов, за 6-24 часа или за 12-24 часа до введения только первой дозы, но не последующих доз анти-Siglec-8 антитела.

В некоторых вариантах осуществления, вторую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, менее 50% от общего объема второй дозы вводят индивидууму в первые 2 часа инфузии. В некоторых вариантах осуществления, менее 30% от общего объема второй дозы вводят индивидууму в первые 2 часа инфузии. В некоторых вариантах осуществления, вторую дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 1 мл/час в течение 15 минут, 5 мл/час в течение 15 минут, 10 мл/час в течение 30 минут, 15 мл/час в течение 30 минут, 25 мл/час в течение 30 минут, 30 мл/час в течение 30 минут, 35 мл/час в течение 30 минут и 40 мл/час в течение 62 минут. В некоторых вариантах осуществления, вторую дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со схемой, показанной в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления, первую и вторую дозы вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со схемой, показанной в Таблице А.

В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг во второй дозе (и необязательно, любых последующих дозах). В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от 1 мг/кг до 10 мг/кг во второй дозе (и необязательно, в любых последующих дозах). В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от 0,1 мг/кг до 3 мг/кг во второй дозе (и необязательно, в любых последующих дозах). В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от 0,1 мг/кг до 1 мг/кг во второй дозе (и необязательно, в любых последующих дозах). В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от примерно 1 мг/кг до примерно 3 мг/кг во второй дозе (и необязательно, любых последующих дозах). В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве 1 мг/кг во второй дозе (и, необязательно, в любых последующих дозах). В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве 3 мг/кг во второй дозе (и, необязательно, в любых последующих дозах). В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму примерно в количестве 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,5

мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,5 мг/кг, 4,0 мг/кг, 4,5 мг/кг, 5,0 мг/кг, 5,5 мг/кг, 6,0 мг/кг, 6,5 мг/кг, 7,0 мг/кг, 7,5 мг/кг, 8,0 мг/кг, 8,5 мг/кг, 9,0 мг/кг, 9,5 мг/кг или 10,0 мг/кг во второй дозе (и необязательно, в любых последующих дозах). В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от примерно 0,1 мг/кг до примерно 1 мг/кг в первой дозе и от примерно 3 мг/кг до примерно 10 мг/кг во второй дозе. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от примерно 1 мг/кг до примерно 3 мг/кг в первой дозе и от примерно 1 мг/кг до примерно 3 мг/кг во второй дозе. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве 1 мг/кг в первой дозе и в количестве 3 мг/кг во второй дозе. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве 3 мг/кг в первой дозе и 10 мг/кг во второй дозе.

В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму во второй дозе (и необязательно, любых последующих дозах) внутривенным или подкожным путем.

В некоторых вариантах осуществления, вторую дозу вводят без введения кортикостероида, по меньшей мере, за 6 часов, по меньшей мере, за 12 часов, в пределах 24 часов, 6-24 часов или 12-24 часов до введения второй дозы. В других вариантах осуществления, кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов, по меньшей мере, за 12 часов, в течение 24 часов, 6-24 часов или 12-24 часов до введения второй дозы. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид представляет собой преднизон. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид представляет собой метилпреднизолон, гидрокортизон или дексаметазон. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводится самостоятельно индивидуумом, которого лечат антителом против Siglec-8. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид (*например*, преднизон) вводят в дозе более 0,5 мг/кг или примерно 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид (*например*, преднизон) вводят в дозе 80 мг. Например, в некоторых вариантах осуществления, способы включают введение индивидууму более 0,5 мг/кг преднизона, по меньшей мере, в течение 6 часов (и необязательно, в течение 24 часов), по меньшей мере, 12 часов (и необязательно, в течение 24 часов), за 6-24 часов, или за 12-24 часа до введения второй дозы анти-Siglec-8 антитела. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение индивидууму 1 мг/кг преднизона, по меньшей мере за 6 часов (и необязательно, в течение 24 часов), по меньшей мере за 12 часов (и необязательно, в течение 24 часов), за 6-24 часа или за 12-24 часа до введения второй дозы анти-Siglec-8 антитела. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение индивидууму 80 мг преднизона по меньшей мере, за 6 часов (и необязательно, в течение 24 часов), по меньшей мере, за 12 часов (и необязательно, в течение 24 часов), за 6-24 часа или за 12-24 часа до введения второй дозы анти-Siglec-8

антитела. В некоторых вариантах осуществления, введение кортикостероида, по меньшей мере, за 6 часов до введения второй дозы снижает риск инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением второй дозы без введения кортикостероида, по меньшей мере, за 6 часов. В некоторых вариантах осуществления, введение кортикостероида, по меньшей мере, за 12 часов до введения второй дозы снижает риск инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением второй дозы без введения кортикостероида, по меньшей мере, за 12 часов. В некоторых вариантах осуществления, введение кортикостероида за 12-24 часа до введения второй дозы снижает риск инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением второй дозы без введения кортикостероида за 12-24. В некоторых вариантах осуществления, введение кортикостероида, по меньшей мере, за 6 часов до введения второй дозы снижает тяжесть инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением второй дозы без введения кортикостероида, по меньшей мере, за 6 часов. В некоторых вариантах осуществления, введение кортикостероида, по меньшей мере, за 12 часов до введения второй дозы снижает тяжесть инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением второй дозы без введения кортикостероида по меньшей мере, за 12 часов. В некоторых вариантах осуществления, введение кортикостероида за 12-24 часа до введения второй дозы снижает тяжесть инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением второй дозы без введения кортикостероида за 12-24 часа. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов, по меньшей мере, за 12 часов, в течение 24 часов, 6-24 часов или 12-24 часов до введения первой и второй доз. В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов, по меньшей мере, за 12 часов, в течение 24 часов, 6-24 часов или 12-24 часов до введения первой и второй доз, но не до какой-либо последующей дозы анти-Siglec-8 антитела.

В некоторых вариантах осуществления, способы дополнительно включают введение кортикостероида индивидууму за 1-2 часа до введения второй дозы (и необязательно, любых последующих доз). В некоторых вариантах осуществления, кортикостероид, вводимый индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы, представляет собой метилпреднизолон. В некоторых вариантах осуществления, 100 мг метилпреднизолона вводят индивидууму в течение 1 часа, примерно 1 часа, в течение 2 часов, примерно 2 часов или за 1-2 часа до введения первой дозы (*например*, внутривенно).

В некоторых вариантах осуществления, способы дополнительно включают введение антигистаминного препарата индивидууму за 1-2 часа до введения второй дозы (и необязательно, любых последующих доз). В некоторых вариантах осуществления, способы могут включать введение антигистаминного препарата в течение 1 часа, примерно 1 часа, в течение 2 часов, примерно 2 часов или 1-2 часов до введения второй дозы (и необязательно, любых последующих доз). В некоторых вариантах осуществления, антигистаминный препарат представляет собой цетиризин. В некоторых вариантах

осуществления, антигистаминный препарат вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления, антигистаминный препарат (*например*, цетиризин) вводят в дозе 10 мг в течение 1 часа, примерно 1 часа, в течение 2 часов, примерно 2 часов или за 1-2 часа до введения второй дозы (и необязательно, любой последующей дозы).

В некоторых вариантах осуществления, способы дополнительно включают введение жаропонижающего или нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (NSAID) индивидууму за 1-2 часа до введения второй дозы (и необязательно, любых последующих доз). В некоторых вариантах осуществления, способы могут включать введение жаропонижающего средства или NSAID в течение 1 часа, примерно 1 часа, в течение 2 часов, примерно 2 часов или 1-2 часов до введения второй дозы (и необязательно, любых последующих доз). В некоторых вариантах осуществления, жаропонижающее или NSAID представляет собой ацетаминофен. В некоторых вариантах осуществления, жаропонижающее или NSAID вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления, жаропонижающее или NSAID (*например*, ацетаминофен) вводят в дозе 975-1000 мг в течение 1 часа, примерно 1 часа, в течение 2 часов, примерно 2 часов или за 1-2 часа до введения второй дозы (и необязательно, любых последующих доз).

В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, способы дополнительно включают введение индивидууму третьей дозы композиции, содержащей антители, которое связывается с Siglec-8 человека (*например*, после введения второй дозы, как описано в настоящем документе). Например, третью дозу можно вводить примерно через 28 дней, примерно через 4 недели или примерно через 1 месяц после введения второй дозы и/или примерно через 56 дней, примерно через 8 недель или примерно через 2 месяца после введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу вводят индивидууму без введения кортикостероида индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов, по меньшей мере, за 12 часов, за 6-24 часа или за 12-24 часа до введения третьей дозы.

В некоторых вариантах осуществления, третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 2 часов до примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 часа до примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 2 часов. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 10 мл/час в течение 30 минут, 25 мл/час в течение 15 минут, 40 мл/час в течение 15 минут, 55 мл/час в течение 15 минут, 70 мл/час в течение 15 минут, 85 мл/час в течение 15 минут и 100 мл/час в течение 16 минут. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со схемой, показанной в Таблице В. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 3 часов. В некоторых вариантах осуществления, третью

дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 2 мл/час в течение 30 минут, 10 мл/час в течение 30 минут, 20 мл/час в течение 30 минут, 40 мл/час в течение 30 минут и 60 мл/час в течение 64 минут. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со схемой, показанной в Таблице С. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 1 мл/час в течение 15 минут, 5 мл/час в течение 15 минут, 10 мл/час в течение 30 минут, 15 мл/час в течение 30 минут, 25 мл/час в течение 30 минут, 30 мл/час в течение 30 минут, 35 мл/час в течение 30 минут и 40 мл/час в течение 62 минут. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со схемой, показанной в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 1 часа. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 24 мл/час в течение 15 минут и 125,3 мл/час в течение 45 минут. В некоторых вариантах осуществления, третью дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со схемой, показанной в Таблице D.

Таблица В. Схема скорости инфузии для 2-часовой инфузии.

Скорость инфузии (мл/ч)	Длительность скорости инфузии (минуты)	Суммарное время инфузии (ч:мин)	Вводимый объем (мл)	Суммарный введенный объем (мл)
10	30	00:30	5	5
25	15	00:45	6,25	11,25
40	15	01:00	10	21,25
55	15	01:15	13,75	35
70	15	01:30	17,5	52,5
85	15	01:45	21,25	73,75
100	16	02:01	26,3	100

Таблица С. Схема скорости инфузии для 3-часовой инфузии.

Скорость инфузии (мл/ч)	Длительность скорости инфузии (минуты)	Суммарное время инфузии (ч:мин)	Вводимый объем (мл)	Суммарный введенный объем (мл)
2	30	00:30	1	1

10	30	01:00	5	6
20	30	01:30	10	16
40	30	02:00	20	36
60	64	03:04	64	100

Таблица Д. Схема скорости инфузии для 1-часовой инфузии.

Скорость инфузии (мл/ч)	Скорость инфузии (мл/мин)	Длительность скорости инфузии (минуты)	Суммарное время инфузии (ч:мин)	Вводимый объем (мл)	Суммарный введенный объем (мл)
24	0,4	15	00:15	6	6
125,3	2,1	45	01:00	94	100

В некоторых вариантах осуществления, первую и вторую дозы композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов, и третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение от примерно 1 часа до примерно 4 часов. Например, в некоторых вариантах осуществления, первую, вторую и третью дозы вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов, *например*, в соответствии с таблицей А. В некоторых вариантах осуществления, первую и вторую дозы вводят в индивидууму путем внутривенного вливания в течение примерно 4 часов, *например*, в соответствии с таблицей А, и третью дозу вводят индивидууму путем внутривенного вливания в течение примерно 3 часов, *например*, в соответствии с таблицей С. В некоторых вариантах осуществления, первую и вторую дозы вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов, *например*, в соответствии с таблицей А, и третью дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 2 часов, *например*, в соответствии с таблицей В. В некоторых вариантах осуществления, первую и вторую дозы вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов, *например*, в соответствии с таблицей А, и третью дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 1 часа, *например*, в соответствии с таблицей Д. Например, третья доза может быть введена индивидууму в течение более короткого времени инфузии, *например*, по решению врача, если после введения первой и/или второй дозы не возникнут или возникнут слабые инфузионные реакции.

В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг в третьей дозе. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от 1 мг/кг до 10 мг/кг в третьей дозе. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве 3 мг/кг в третьей дозе. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве 1

мг/кг в третьей дозе. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве 1 мг/кг в первой дозе, а затем в количестве 3 мг/кг во второй и третьей дозах.

В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, способы дополнительно включают введение индивидууму четвертой дозы композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека (*например*, после введения третьей дозы, как описано в настоящем документе). Например, четвертую дозу можно вводить примерно через 28 дней, примерно через 4 недели или примерно через 1 месяц после введения третьей дозы; примерно через 56 дней, примерно через 8 недель или примерно через 2 месяца после введения второй дозы; и/или примерно через 84 дня, примерно через 12 недель или примерно через 3 месяца после введения первой дозы. В некоторых вариантах осуществления, четвертую дозу вводят индивидууму без введения кортикостероида индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов, по меньшей мере, за 12 часов, за 6-24 часа или за 12-24 часа до введения третьей дозы. В некоторых вариантах осуществления, индивидууму вводят шесть или более доз композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека (*например*, каждые 28 дней, каждые 4 недели или каждый месяц).

В некоторых вариантах осуществления, четвертую и/или последующую дозу(ы) композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 2 часов до примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, четвертую и/или последующую дозу(ы) композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 часа до примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, четвертую и/или последующую дозу(ы) композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 2 часов. В некоторых вариантах осуществления, четвертая и/или последующая доза(ы) композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 10 мл/час в течение 30 минут, 25 мл/час в течение 15 минут, 40 мл/час в течение 15 минут, 55 мл/час в течение 15 минут, 70 мл/час в течение 15 минут, 85 мл/час в течение 15 минут и 100 мл/час в течение 16 минут. В некоторых вариантах осуществления, четвертую и/или последующую дозу(ы) композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со схемой, показанной в Таблице В. В некоторых вариантах осуществления, четвертую и/или последующую дозу(ы) композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 3 часов. В некоторых вариантах осуществления, четвертую и/или последующую дозу(ы) композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 2 мл/час в течение 30 минут, 10 мл/час в течение 30 минут, 20 мл/час в течение 30 минут, 40 мл/час в течение 30 минут и 60 мл/час в течение 64 минут. В некоторых вариантах осуществления, четвертую и/или последующую дозу(ы) композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со схемой, показанной в Таблице С.

В некоторых вариантах осуществления, четвертую и/или последующую дозу(ы) композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов. В некоторых вариантах осуществления, четвертую и/или последующую дозу(ы) композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 1 мл/час в течение 15 минут, 5 мл/час в течение 15 минут, 10 мл/час в течение 30 минут, 15 мл/час в течение 30 минут, 25 мл/час в течение 30 минут, 30 мл/час в течение 30 минут, 35 мл/час в течение 30 минут и 40 мл/час в течение 62 минут. В некоторых вариантах осуществления, четвертую и/или последующую дозу(ы) композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со схемой, показанной в Таблице А. В некоторых вариантах осуществления, четвертую и/или последующую дозу(ы) композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 1 часа. В некоторых вариантах осуществления, четвертую и/или последующую дозу(ы) композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 24 мл/час в течение 15 минут и 125,3 мл/час в течение 45 минут. В некоторых вариантах осуществления, четвертую и/или последующую дозу(ы) композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со схемой, показанной в Таблице D.

В некоторых вариантах осуществления, первую и вторую дозы композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов, и третью и четвертую дозы композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода примерно от 1 часа до примерно 4 часов. Например, в некоторых вариантах осуществления, первую, вторую, третью и четвертую дозы вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов, *например*, в соответствии с таблицей А. В некоторых вариантах осуществления, первую и вторую дозы вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов, *например*, в соответствии с таблицей А, и третью и/или четвертую дозы вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода примерно 3 часов, *например*, согласно Таблица С. В некоторых вариантах осуществления, первую и вторую дозы вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов, *например*, в соответствии с таблицей А, и третью и/или четвертую дозы вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 2 часов, *например*, в соответствии с таблицей В. В некоторых вариантах осуществления, первую и вторую дозы вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода примерно 4 часов, *например*, в соответствии с таблицей А, а третью и/или четвертую дозы вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 1 часа, *например*, в соответствии с таблицей D. В некоторых вариантах осуществления, первую и вторую дозы вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода примерно 4 часов (*например*, в соответствии с таблицей А), после чего следует 4 последовательных дозы (*например*, вводимых каждые 28 дней, каждые 4 недели или каждый месяц), вводимых индивидууму внутривенной инфузией в течение периода времени от примерно 1 часа до примерно 4 часа (*например*, согласно таблице В, С или D). Например, третью, четвертую

и/или последующую дозу(ы) вводят индивидууму в течение более короткого времени инфузии, *например*, по решению врача, если после введения первой, второй и/или третьей дозы не возникнут или возникнут слабые инфузионные реакции.

В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг в четвертой дозе. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от 1 мг/кг до 10 мг/кг в четвертой дозе. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве 3 мг/кг в четвертой дозе. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве 1 мг/кг в четвертой дозе. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве 1 мг/кг в первой дозе, затем 3 мг/кг во второй, третьей и четвертой дозах. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве 1 мг/кг в первой дозе, и затем в количестве 3 мг/кг в течение 5 последующих доз (*например*, вводят каждые 28 дней, каждые 4 недели или каждый месяц).

Описанные в настоящем документе антитела, которые связываются с Siglec-8 человека, можно использовать либо отдельно, либо в комбинации с другими агентами в описанных в настоящем документе способах. Такая комбинированная терапия, упомянутая выше, включает комбинированное введение (где два или несколько терапевтических агента включены в один и тот же или отдельные составы) и отдельное введение, и в этом случае введение антитела по настоящему изобретению может происходить до, одновременно и/или 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 нескольких дополнительных терапевтических средств происходит в течение примерно одного месяца, примерно двух месяцев, примерно трех месяцев, примерно четырех месяцев, примерно пяти месяцев или примерно шести месяцев между ними. В некоторых вариантах осуществления, введение анти-Siglec-8 антитела, описанного в настоящем документе, и введение одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов происходят в течение примерно одной недели, примерно двух недель или примерно трех недель между ними. В некоторых вариантах осуществления, введение анти-Siglec-8 антитела, описанного в настоящем документе, и введение одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов происходит в течение примерно одного дня, примерно двух дней, примерно трех дней, примерно четырех дней, примерно пяти дней или примерно шести дней между ними.

Способы по настоящему изобретению можно использовать по целому ряду показаний, *например*, для лечения заболеваний или нарушений, связанных с эозинофилами и/или тучными клетками. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума, подлежащего лечению в соответствии со способом по настоящему

изобретению, имеется или было диагностировано заболевание или нарушение, характеризующееся одним или несколькими из следующих факторов: увеличение числа активированных эозинофилов, повышение активности тучных клеток, экспрессирующих Siglec-8, увеличение эозинофилов и/или тучных клеток или повышенная активация эозинофилов и/или тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления, у индивидуума, подлежащего лечению в соответствии со способом по настоящему изобретению, диагностировано или было диагностировано одно или несколько заболеваний или нарушений, выбранных из группы, состоящей из: хронического риносинусита с сопутствующей астмой, аспирин-индуцированного респираторного заболевания, приобретенной не-атопической астмы с заболеванием носовых пазух, хронической обструктивной болезни легких, фиброзного заболевания, предфиброзного заболевания, распространенного системного мастоцитоза, вялотекущего системного мастоцитоза (ISM), воспалительного заболевания кишечника (IBD), эозинофильного эзофагита (ЕОЕ), эозинофильного гастрита (EG), эозинофильного гастроэнтерита (EGE), эозинофильного дуоденита, эозинофильного колита (ЕОС), тучноклеточного гастрита или тучноклеточного гастроэнтерита, гастрита или гастроэнтерита с повышенными тучными клетками, синдрома раздраженного кишечника с повышенными тучными клетками, функционального заболевания желудочно-кишечного тракта, аллергического конъюнктивита, гигантского папиллярного конъюнктивита, хронической крапивницы, аллергического бронхолегочного аспергиллеза (ABPA), аллергической астмы, астмы с эозинофильным или тучноклеточным фенотипом, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом (EGPA), глютеновой болезни, гастропареза, гиперэозинофильного синдрома, атопического дерматита, анафилаксии, ангионевротического отека, синдрома/нарушения активации тучных клеток и эозинофильного фасциита. В некоторых вариантах осуществления, индивидуумом, подлежащим лечению в соответствии со способом по настоящему изобретению, является человек. В некоторых вариантах осуществления, перед введением композиции индивидуум потерпел неудачу при предшествующем лечении (*например*, стандартном лечении) одного или нескольких показаний, описанных выше (*например*, EG, EGE или ЕоЕ). В некоторых вариантах осуществления, перед введением композиции у индивидуума были симптомы заболевания, которые не контролировались должным образом предшествующим лечением (*например*, стандартным лечением) одного или нескольких показаний, описанных выше (*например*, EG, EGE или ЭоЕ). Неограничивающие примеры предшествующего лечения включают, среди прочего, ингибиторы протонной помпы (PPI), системные или местные кортикостероиды и/или диету.

В некоторых вариантах осуществления, в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, способы приводят к снижению количества эозинофилов по сравнению с количеством эозинофилов до введения композиции, *например*, в образце биопсии, полученном от индивидуума (для подсчета тканевых эозинофилов), или периферической крови (для подсчета эозинофилов крови).

Например, у человека может быть EG, EGE и/или EOE, и образец биопсии взят из слизистой оболочки желудка или двенадцатиперстной кишки. В некоторых вариантах осуществления, способы приводят к уменьшению количества эозинофилов в тканях, по меньшей мере, на 75%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85% или по меньшей мере, на 90% по сравнению с количеством эозинофилов в тканях до введения композиции, *например*, в образце биопсии (*например*, из пищевода, слизистой оболочки желудка или слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки), полученном от человека с EG, EGE и/или EOE. В некоторых вариантах осуществления, способы приводят к уменьшению одного или нескольких симптомов у индивидуума по сравнению с одним или несколькими симптомами у индивидуума до введения композиции (*например*, одним или несколькими из болей в животе, тошноты, диареи, рвоты, чувства сытости перед окончанием приема пищи, потери аппетита, спазмов в животе и вздутия живота у людей с EG, EGE и/или EOE). В некоторых вариантах осуществления, способы приводят к снижению, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 35%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 45%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 55%, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 65%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 75%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85% или, по меньшей мере, на 90% тяжести и/или частоты одного или нескольких симптомов у индивидуума по сравнению с одним или несколькими симптомами в индивидуума перед введением композиции (*например*, одним или несколькими из болей в животе, тошноты, диареи, рвоты, чувства сытости перед окончанием приема пищи, потери аппетита, спазмов в животе и вздутия живота у людей с EG, EGE и/или EOE). В некоторых вариантах осуществления, способы приводят к частоте ответов по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60% или по меньшей мере, 70%, *например*, у лиц с EG, EGE и/или EOE. В некоторых вариантах осуществления, частота ответа отражает долю лиц со снижением количества эозинофилов в биопсии ткани и/или уменьшением симптомов по сравнению с состоянием до введения композиции. В некоторых вариантах осуществления, частота ответа отражает долю лиц со снижением количества эозинофилов в биопсии ткани на >75% и снижением симптомов >30% по сравнению с состоянием до введения композиции. В некоторых вариантах осуществления, способы приводят к снижению тяжести дисфагии у индивидуума, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 35%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 45% или по меньшей мере, на 50% по сравнению с тяжестью дисфагии у индивидуума до введения композиции (*например*, у индивидуума с EG, EGE и/или EOE).

Антитела

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к выделенным антителам, которые связываются с Siglec-8 человека (*например*, антителу-агонисту, которое связывается с Siglec-8 человека). В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе, обладает одной или несколькими из следующих характеристик: (1) связывается с Siglec-8 человека; (2) связывается с

внечелюстным доменом Siglec-8 человека; (3) связывает человеческий Siglec-8 с более высокой аффинностью, чем антитело 2E2 мыши и/или антитело 2C4 мыши; (4) связывает Siglec-8 человека с более высокой авидностью, чем антитело 2E2 мыши и/или антитело 2C4 мыши; (5) имеет T_m примерно 70°C-72°C или выше в анализе теплового сдвига; (6) имеет пониженную степень фукозилирования или не является фукозилированным; (7) связывает Siglec-8 человека, экспрессированный на эозинофилах, и индуцирует апоптоз эозинофилов; (8) связывает Siglec-8 человека, экспрессированный на тучных клетках, и истощает или уменьшает количество тучных клеток; (9) связывает Siglec-8 человека, экспрессированный на тучных клетках, и ингибирует FcεRI-зависимую активность тучных клеток (*например*, высвобождение гистамина, высвобождение PGD₂, поток Ca²⁺ и/или высвобождение β-гексозаминидазы и т.д.); (10) был сконструирован для улучшения активности ADCC; (11) связывает Siglec-8 человека, экспрессируемый на тучных клетках, и убивает тучные клетки за счет активности ADCC (in vitro и/или in vivo); (12) связывается с Siglec-8 человека и примата, отличного от человека; (13) связывается с доменом 1, доменом 2 и/или доменом 3 Siglec-8 человека или связывает полипептид Siglec-8, содержащий домен 1, домен 2 и/или домен 3 Siglec-8 человека (*например*, слитые белки, описанные в настоящем документе); и (14) истощает активированные эозинофилы с EC₅₀ меньше, чем EC₅₀ мышинового антитела 2E2 или 2C4. Любое из антител, описанных в патенте США № 9,546,215 и/или WO 2015089117 могут найти применение в способах, композициях и наборах, представленных в настоящем документе.

В одном аспекте настоящее 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 Siglec-8 человека, экспрессированным на тучных клетках, и истощает или уменьшает количество тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на тучных клетках, и ингибирует опосредованную тучными клетками активность.

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, антитело, описанное в настоящем документе, 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, антитело, описанное в настоящем документе, 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 внеклеточного домена Siglec-8 человека. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на эозинофилах, и индуцирует апоптоз эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, 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 опосредованную тучными клетками активность. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, связывается с Siglec-8 человека, экспрессированным на тучных клетках, и уничтожает тучные клетки за счет активности ADCC. В некоторых вариантах осуществления, антитело, описанное в настоящем документе, истощает тучные клетки и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления, данное антитело истощает активированные эозинофилы и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления, антитело в настоящем документе (*например*, не фукозилированное анти-Siglec-8 антитело) истощает эозинофилы крови и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления, антитело в настоящем документе (*например*, не фукозилированное анти-Siglec-8 антитело) истощает количество эозинофилов в периферической крови и ингибирует активацию тучных клеток.

В настоящем документе представлено выделенное анти-Siglec-8 антитело, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 примата, отличного от человека. Идентификация антител с перекрестной реактивностью у приматов может быть полезной для доклинического тестирования анти-Siglec-8 антител у приматов, отличных от человека. В одном аспекте, изобретение относится к антителам, которые связываются с Siglec-8 примата, отличного от человека. В одном аспекте, изобретение относится к антителам, которые связываются с Siglec-8 человека и Siglec-8 примата, отличного от человека. В некоторых вариантах осуществления, Siglec-8 примата, отличного от

человека, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:118 или ее часть. В некоторых вариантах осуществления, Siglec-8 примата, отличного от человека, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:119 или ее часть. В некоторых вариантах осуществления, примат, отличный от человека, представляет собой бабуина (*например*, Papio Anubis). В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 примата, отличного от человека, связывается с эпитопом в домене 1 Siglec-8 человека. В другом 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 примата, отличного от человека, 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, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 примата, отличного от человека, представляет собой гуманизованное антитело, химерное антитело или антитело человека. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 примата, отличного от человека, представляет собой антитело мыши. В некоторых вариантах осуществления, антитело, которое связывается с Siglec-8 человека и Siglec-8 примата, отличного от человека, представляет собой антитело IgG1 человека.

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

В одном аспекте, предложены анти-Siglec-8 антитела, которые конкурируют с антителом 2E2 мыши и антителом 2C4 мыши, связывающимся с Siglec-8. Также предоставлены анти-Siglec-8 антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитело 2E2 мыши и антитело 2C4 мыши. Антитела мыши к Siglec-8, антитела 2E2 и 2C4, 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 изобретения 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 изобретения, представлены композиции, содержащие анти-Siglec-8 антитела или полинуклеотиды, кодирующие анти-Siglec-8 антитела. В некоторых вариантах осуществления, композиция по настоящему изобретению представляет собой фармацевтический состав для лечения заболевания или нарушения, связанного с эозинофилами или тучными клетками, по настоящему изобретению.

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

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

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, антитело, описанное в настоящем документе, 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, антитело, описанное в настоящем документе, 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 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. 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 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 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. 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 с Siglec-8 человека и Siglec-8 примата, отличного от человека.

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 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, 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 примата, отличного от человека.

В одном аспекте, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело,

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.

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:89, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:92, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную 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.

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: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.

Анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе, может содержать любую подходящую последовательность каркасного переменного домена при условии, что антитело сохраняет способность связывать Siglec-8 человека. Используемые в настоящем документе каркасные области тяжелой цепи обозначены как «HC-FR1-FR4», и каркасные области легкой цепи обозначены как «LC-FR1-FR4». В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело содержит каркасную последовательность переменного 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 переменного 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 переменного 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 HC-FR1-HC-FR4

последовательности 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 HC-FR1-HC-FR4 последовательности 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 LC-FR1-LC-FR4 последовательности 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 LC-FR1-LC-FR4 последовательности 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, и 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, и 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, и 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, и 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, и 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, и переменный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.

В некоторых вариантах осуществления, последовательности HVR тяжелой цепи включают следующие:

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

В некоторых вариантах осуществления, последовательности HVR тяжелой цепи включают следующие:

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

В некоторых вариантах осуществления, последовательности FR тяжелой цепи 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 WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:46)).

В некоторых вариантах осуществления, последовательности HVR легкой цепи включают 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, последовательности HVR легкой цепи включают 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, последовательности FR легкой цепи включают следующие:

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

GVPARFSGSGSGTDYTLTISSELEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:56);
 GVPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC (SEQ ID NO:57); или
 GIPARFSGSGSGTDYTLTISSELEPEDFAVYYC (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*, гуманизированное 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, содержащую 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 одном аспекте, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее вариabельный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO:11-14, и/или содержащее вариabельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO:16-22. В одном аспекте, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее вариabельный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO:11-14, и/или содержащее вариabельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO:23 или 24. В одном аспекте, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее вариabельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO:6 и/или содержащее вариabельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO:16 или 21.

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

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее вариabельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO:2-14. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее вариabельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности, 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 вариabельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело содержит

вариабельный 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 вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO:16-24. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлено анти-Siglec-8 антитело, содержащее вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности, 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 вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16 или 21. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:109-111.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к анти-Siglec-8 антителу, содержащему (a) одну, две или три VH HVR, выбранных из представленных в таблице 1, и/или (b) одну, две или три VL HVR, выбранных из представленных в таблице 1.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к анти-Siglec-8 антителу, содержащему (a) одну, две или три HVR VH, выбранные из представленных в таблице 2, и/или (b) одну, две или три HVR VL, выбранные из представленных в таблице 2.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к анти-Siglec-8 антителу, содержащему (a) одну, две, три или четыре FR VH, выбранные из представленных в таблице 3, и/или (b) одну, две, три или четыре FR VL, выбранные из представленных 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, представленного в таблице 4, например, антитело НАКА, антитело НАКВ, антитело НАКС и т. д.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности HVR антител

Цепь антитела	HVR1	HVR2	HVR3
<i>антитело 2E2</i>			

Тяжелая цепь	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYYSMEY SEQ ID NO:63
Легкая цепь	SATSSVSYMH SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPFT SEQ ID NO:66
<i>Варианты гуманизированной тяжелой цепи 2E2 RHA, 2E2 RHB, 2E2 RHC, 2E2 RHD, 2E2 RHE, 2E2 RHF, 2E2 RHG, 2E2 RHA2 и 2E2 RHB2</i>			
Тяжелая цепь	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYYSMEY SEQ ID NO:63
<i>Варианты гуманизированной легкой цепи 2E2 RKA, 2E2 RKB, 2E2 RKC, 2E2 RKD, 2E2 RKE, 2E2 RKF и 2E2 RKG</i>			
Легкая цепь	SATSSVSYMH SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPFT SEQ ID NO:66
<i>Варианты гуманизированной тяжелой цепи 2E2 RHE S-G, 2E2 RHE E-D, 2E2 RHE Y-V и 2E2 RHE тройной</i>			
2E2 RHE S-G	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYGMEY SEQ ID NO:67
2E2 RHE E-D	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYSM DY SEQ ID NO:68
2E2 RHE Y-V	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYYSMEV SEQ ID NO:69
2E2 RHE тройной	IYGAH SEQ ID NO:61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO:62	DGSSPYYYGMD V SEQ ID NO:70
<i>Варианты гуманизированной легкой цепи 2E2 RKA F-Y и 2E2 RKF F-Y</i>			
2E2 RKA F-Y	SATSSVSYMH SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPYT SEQ ID NO:71
2E2 RKF F-Y	SATSSVSYMH SEQ ID NO:64	STSNLAS SEQ ID NO:65	QQRSSYPYT SEQ ID NO:71

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

Антитело	Цепь	HVR1	HVR2	HVR3
1C3	Тяжелая цепь	SYAMS SEQ ID NO:88	IISGGSYTYYS VKG SEQ ID NO:91	HETAQAAWFA Y SEQ ID NO:94

1H10	Тяжелая цепь	DYYMY SEQ ID NO:89	RIAPEDGDTEYAP KFQG SEQ ID NO:92	EGNYYGSSILD Y SEQ ID NO:95
4F11	Тяжелая цепь	SSWMN SEQ ID NO:90	QIYPGDDYTNNGKFKG SEQ ID NO:93	LGPYGPFAD SEQ ID NO:96
1C3	Легкая цепь	SASSSVSYM SEQ ID NO:97	DTSKLAY SEQ ID NO:100	QQWSSNPPT SEQ ID NO:103
1H10	Легкая цепь	RASQDITNYL N SEQ ID NO:98	FTSRLHS SEQ ID NO:101	QQGNTLPWT SEQ ID NO:104
4F11	Легкая цепь	SASSSVSYM SEQ ID NO:99	DTSSLAS SEQ ID NO:102	QQWNSDPYT SEQ ID NO:105

Таблица 3. Аминокислотные последовательности FR антител

Тяжелая цепь	FR1	FR2	FR3	FR4
2E2	QVQLKESGPG L VAPSQSL SITCT VSGFSLT (SEQ ID NO:25)	WVRQPPGK GLE WLG (SEQ ID NO:30)	RLSISKDNS KSKS QVFLKINS LQT DDTALYYC AR (SEQ ID NO:37)	WGQGT SVTVS S (SEQ ID NO:44)
2E2 RHA	EVQLVESGG GL VQPGGSLR LSC AASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGK GLE WVS (SEQ ID NO:31)	RFTISKDNS KSKN TVYLMNS LR AEDTAVY YCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGT T TVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHB	EVQLVESGG GL VQPGGSLR LSC AVSGFSLT (SEQ ID NO:27)	WVRQAPGK GLE WLG (SEQ ID NO:32)	RLSISKDNS KSKN TVYLMNS LR AEDTAVY YCA R (SEQ ID NO:39)	WGQGT T TVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHC	EVQLVESGG GL VQPGGSLR LSC AVSGFSLT (SEQ ID NO:27)	WVRQAPGK GLE WVS (SEQ ID NO:31)	RFTISKDNS KSKN TVYLMNS LR AEDTAVY YCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGT T TVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHD	EVQLVESGG GL	WVRQAPGK GLE	RFTISKDNS KSKN	WGQGT T TVTVS

	VQPGGSLRLSC AASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WLS (SEQ ID NO:33)	TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLE WVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHF	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLE WVS (SEQ ID NO:31)	RLTISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:40)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHG	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLE WVS (SEQ ID NO:31)	RFSISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:41)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHA2	QVQLQESGPGI 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)
2E2 RHB2	QVQLQESGPGI VKPSETLSLTCT VSGFSLT (SEQ ID NO:29)	WVRQPPGKGLE WLG (SEQ ID NO:36)	RLSISKDNSKN QVSLKLSSVTA ADTAVYYCAR (SEQ ID NO:43)	WGQGTTLVTVS S (SEQ ID NO:46)
2E2 RHE S-G	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLE WVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE E-D	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC	WVRQAPGKGLE WVG	RFTISKDNSKN TVYLQMNSLR	WGQGTTVTVS S

	AASGFSLT (SEQ ID NO:26)	(SEQ ID NO:34)	AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	(SEQ ID NO:45)
2E2 RHE Y-V	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLE WVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE тройной	EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSC AASGFSLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLE WVG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKN TVYLQMNSLR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVS S (SEQ ID NO:45)
Легкая цепь	FR1	FR2	FR3	FR4
2E2	QIILTQSPAIMS ASPGEKVSITC (SEQ ID NO:47)	WFQQKPGTSPK LWIY (SEQ ID NO:50)	GVPVRFSGSGS GTSYSLTISRM EAEDAATYYC (SEQ ID NO:54)	FGSGTKLEIK (SEQ ID NO:59)
RKA	EIVLTQSPATLS LSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPR LLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGS GTDFTLTISSE PEDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKB	EIILTQSPATLSL SPGERATLSC (SEQ ID NO:49)	WFQQKPGQAPR LWIY (SEQ ID NO:52)	GVPARFSGSGS GTDYTLTISSL EPEDFAVYYC (SEQ ID NO:56)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKC	EIILTQSPATLSL SPGERATLSC (SEQ ID NO:49)	WFQQKPGQAPR LLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGS GTDFTLTISSE PEDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKD	EIVLTQSPATLS LSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPR LWIY (SEQ ID NO:52)	GIPARFSGSGS GTDFTLTISSE PEDFAVYYC	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)

			(SEQ ID NO:55)	
RKE	EIVLTQSPATLS LSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPR LLIY (SEQ ID NO:51)	GVPARFSGSGS GTDFTLTISSE PEDFAVYYC (SEQ ID NO:57)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKF	EIVLTQSPATLS LSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPR LLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGS GTDYTLTISSL EPEDFAVYYC (SEQ ID NO:58)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKG	EIVLTQSPATLS LSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WYQQKPGQAP RLLIY (SEQ ID NO:53)	GIPARFSGSGS GTDFTLTISSE PEDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKA F-Y	EIVLTQSPATLS LSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPR LLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGS GTDFTLTISSE PEDFAVYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKF F-Y	EIVLTQSPATLS LSPGERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPR LLIY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGS GTDYTLTISSL EPEDFAVYYC (SEQ ID NO:58)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)

Таблица 4. Аминокислотные последовательности переменных областей антител

Название антитела	Варибельная тяжелая цепь	Варибельная легкая цепь
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)

HAKC	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 мутация	2E2 RHA2 (SEQ ID NO:9)	2E2 RKF F-Y мутация (SEQ ID NO:24)
HB2KF мутация	2E2 RHB2 (SEQ ID NO:10)	2E2 RKF F-Y мутация (SEQ ID NO:24)
HEKA мутация	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKA F-Y мутация (SEQ ID NO:23)
HEKF мутация	2E2 RHE (SEQ ID NO:6)	2E2 RKF F-Y мутация (SEQ ID NO:24)
HA2KF мутация	2E2 RHA (SEQ ID NO:2)	2E2 RKF F-Y мутация (SEQ ID

		NO:24)
HBKF мутация	2E2 RHB (SEQ ID NO:3)	2E2 RKF F-Y мутация (SEQ ID NO:24)
HCKF мутация	2E2 RHC (SEQ ID NO:4)	2E2 RKF F-Y мутация (SEQ ID NO:24)
HDKF мутация	2E2 RHD (SEQ ID NO:5)	2E2 RKF F-Y мутация (SEQ ID NO:24)
HFKF мутация	2E2 RHF (SEQ ID NO:7)	2E2 RKF F-Y мутация (SEQ ID NO:24)
HGKF мутация	2E2 RHG (SEQ ID NO:8)	2E2 RKF F-Y мутация (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	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)

	NO:12)	
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 мутация	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKF F-Y мутация (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 Тройной-КА	2E2 RHE тройной (SEQ ID NO:14)	2E2 RKA (SEQ ID NO:16)
RHE Тройной-КВ	2E2 RHE тройной (SEQ ID NO:14)	2E2 RKB (SEQ ID NO:17)
RHE Тройной-КС	2E2 RHE тройной (SEQ ID NO:14)	2E2 RKC (SEQ ID NO:18)
RHE Тройной-КД	2E2 RHE тройной (SEQ ID NO:14)	2E2 RKD (SEQ ID NO:19)
RHE Тройной-КЕ	2E2 RHE тройной (SEQ ID NO:14)	2E2 RKE (SEQ ID NO:20)
RHE Тройной-КФ	2E2 RHE тройной (SEQ ID NO:14)	2E2 RKF (SEQ ID NO:21)
RHE Тройной-КГ	2E2 RHE тройной (SEQ ID	2E2 RKG (SEQ ID NO:22)

	NO:14)	
RHE Тройной-KF мутация	2E2 RHE тройной (SEQ ID NO:14)	2E2 RKF F-Y мутация (SEQ ID NO:24)
RHE Y-VKF мутация	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO:13)	2E2 RKF F-Y мутация (SEQ ID NO:24)
RHE E-DKF мутация	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO:12)	2E2 RKF F-Y мутация (SEQ ID NO:24)

Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, тяжелые цепи которых обозначены соответственно α , δ , ϵ , γ и μ . Классы γ и α далее подразделяются на подклассы, *например*, люди экспрессируют следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Антитела IgG1 могут существовать в виде нескольких полиморфных вариантов, называемых аллотипами (обсуждается в Jefferis and Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4 1-7), любой из которых подходит для использования в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения. Обычными аллотипическими вариантами в человеческих популяциях являются те, которые 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, антитело представляет собой антитело IgG1. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой антитело IgG4. В некоторых вариантах осуществления, IgG4 человека содержит аминокислотную замену S228P, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, 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 представляет собой лирентелимаб. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело индуцирует апоптоз активированных эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело индуцирует апоптоз покоящихся эозинофилов. 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 уменьшает 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 тучные клетки, экспрессирующие Siglec-8, в ткани. В некоторых вариантах осуществления, антитело истощает или уменьшает тучные клетки, экспрессирующие Siglec-8, в биологической жидкости.

1. Аффинность антител

В некоторых аспектах, анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе, связывается с Siglec-8 человека примерно с такой же или более высокой аффинностью и/или более высокой авидностью по сравнению с антителом 2E2 мыши и/или антителом 2C4 мыши. В некоторых вариантах осуществления, анти-Siglec-8 антитело по настоящему изобретению имеет константу диссоциации (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 150 нМ, ≤ 100 нМ, ≤ 50 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} М до 10^{-13} М, например, от 10^{-9} М до 10^{-13} М). В некоторых вариантах осуществления, 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 можно определить с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса. Например, K_d или значение K_d можно измерить с помощью BIAcore™-2000 или BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.) при 25°C с иммобилизованными чипами антигена CM5 при ~10 единицах ответа (RU). Коротко, карбоксиметилированные декстрановые биосенсорные чипы (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-человеческое Fc) разбавляют 10 мМ ацетатом натрия, pH 4,8, перед инъекцией со скоростью потока 30 мкл/минуту и дополнительно иммобилизуют с анти-Siglec-8 антителом. Для кинетических измерений, двукратные серийные разведения димерного Siglec-8 впрыскивают в PBS с 0,05% Tween 20 (PBST) при 25°C со скоростью потока приблизительно 25 мкл/мин. Скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) рассчитывают с использованием простой модели связывания Ленгмюра один к одному (BIAcore® Evaluation Software, версия 3.2) путем одновременной подгонки сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (K_d) рассчитывают как отношение k_{off}/k_{on} . См., например, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881.

В другом варианте, биослойная интерферометрия может быть использована для определения аффинности анти-Siglec-8 антител к Siglec-8. В типовом анализе, меченный Siglec-8-Fc белок 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 прибора, как, например, система Octet Red 384 System (ForteBio).

Аффинность связывания анти-Siglec-8 антитела можно, например, также определить с помощью анализа Скэтчарда, описанного Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980) с использованием стандартных способов, 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 можно определить с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса. Например, K_d или значение K_d можно измерить с помощью VIAcore T100. Иммобилизованные антитела (например, анти-человеческий Fc козы и анти-мышинный Fc козы) иммобилизуют на чипе CM5. 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 в различных концентрациях, например, в диапазоне концентраций от 15 нМ до 1,88 пМ. Антитела иммобилизуют и делают высокоэффективные инъекции с последующей диссоциацией. Проточные клетки регенерируют буфером, например, 50 мМ глицина, pH 1,5. Результаты бланкируют с пустой эталонной клеткой и несколькими инъекциями буфера для анализа и анализируют с глобальными параметрами соответствия 1:1.

3. Конкурентные анализы

Конкурентные анализы можно использовать для определения того, связывают ли два антитела один и тот же эпитоп, распознавая идентичные или пространственно перекрывающиеся эпитопы, или одно антитело конкурентно ингибирует связывание другого антитела с антигеном. Эти анализы известны в данной области техники. Как правило, антиген или антигенэкспрессирующие клетки иммобилизуют на многолуночном планшете и измеряют способность не меченых антител блокировать связывание меченых антител. Обычными метками для таких конкурентных анализов являются радиоактивные метки или ферментные метки. В некоторых вариантах осуществления, описанное в настоящем документе анти-Siglec-8 антитело конкурирует с описанным в настоящем документе антителом 2E2 за связывание с эпитопом, присутствующим на клеточной поверхности клетки (*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 поверхности клетки (*например*, тучной клетки). В некоторых вариантах осуществления, описанное в настоящем документе анти-Siglec-8 антитело конкурирует с описанным в настоящем документе антителом 2C4 за связывание с эпитопом, присутствующим на поверхности клетки (*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 указано в патенте США № 8,207,305), и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4 (как указано в патенте США № 8,207,305), за связывание с эпитопом, присутствующим на поверхности клетки (*например*, тучной клетки).

4. Термическая стабильность

В некоторых аспектах, анти-Siglec-8, описанный в настоящем документе, имеет температуру плавления (T_m), по меньшей мере, примерно 70°C , по меньшей мере, примерно 71°C или по меньшей мере, примерно 72°C в анализе теплового сдвига. В типовом анализе теплового сдвига образцы, содержащие гуманизированное анти-Siglec-8 антитело, инкубируют с флуоресцентным красителем (Sypro Orange) в течение 71 цикла с увеличением на 1°C за цикл в qPCR 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, повышает 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 типовом 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 PBMC, содержащие NK и LGL, или лейкоциты, имеющие Fc рецепторы на клеточной поверхности, такие как нейтрофилы, эозинофилы и макрофаги. Эффекторные клетки могут быть выделены из любого источника, включая индивидуумов с представляющим интерес заболеванием. Клетка-мишень представляет собой любую клетку, которая экспрессирует на клеточной поверхности антигены, которые могут распознавать тестируемые антитела. Примером такой клетки-мишени является эозинофил, который экспрессирует Siglec-8 на клеточной поверхности. Другим примером такой клетки-мишени является клеточная линия (*например*, клеточная линия Ramos), которая экспрессирует Siglec-8 на клеточной поверхности (*например*, Ramos 2C10). Клетки-мишени могут быть помечены реагентом, позволяющим 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, тучные клетки человека выделяют из тканей или биологических жидкостей человека 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 среде Complete RPMI в стерильном 96-луночном планшете с U-образным дном и инкубируют в присутствии или в отсутствие анти-Siglec-8 антител в течение 30 минут при концентрациях в диапазоне от 0,0001 нг/мл до 10 мкг/мл. Образцы инкубируют в течение от 4 до 48 дополнительных часов с очищенными естественными киллерами (NK) или свежими PBL или без них, чтобы вызвать ADCC. Гибель клеток в результате апоптоза или ADCC анализируют с помощью проточной цитометрии с использованием флуоресцентных конъюгированных антител для обнаружения тучных клеток (CD117 и FcεR1) и аннексина-V и 7AAD для различения живых и мертвых или умирающих клеток. Окрашивание аннексином-V и 7AAD проводят в соответствии с инструкциями производителя.

В некоторых аспектах, анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе, ингибирует опосредованную тучными клетками активность. Триптазу тучных клеток

используют в качестве биомаркера для определения общего числа 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 количества тучных клеток. См., *например*, публикацию заявки на патент США № US 20110293631, где приведен типовой анализ активности тучных клеток.

Е. Получение антител

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

1. Фрагменты антител

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

Для получения фрагментов антител были разработаны различные методы. Традиционно, эти фрагменты получали путем протеолитического перевара 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 получены непосредственно рекомбинантными клетками-хозяевами. Все Fab, Fv и ScFv фрагменты антител могут экспрессироваться и секретироваться из E. coli, что позволяет легко получать большие количества этих фрагментов. Фрагменты антител могут быть выделены из фаговых библиотек антител, описанных выше. Альтернативно, Fab'-SH фрагменты могут быть непосредственно выделены из E.coli и химически связаны с образованием фрагментов F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом, F(ab')₂ фрагменты могут быть выделены непосредственно из рекомбинантной культуры клеток-хозяев. Fab и F(ab')₂ фрагменты с увеличенным периодом полужизни *in vivo*, содержащие остатки эпитопа, связывающего рецептор реутилизации, описаны в патенте США № 5,869,046. Специалисту в данной области техники будут очевидны и другие способы получения фрагментов антител. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой одноцепочечный Fv фрагмент (scFv). См. WO 93/16185; патенты США. №№ 5,571,894; и 5,587,458. Fv и scFv представляют собой единственные виды с интактными комбинирующими сайтами, лишенными константных областей; таким образом, они могут подходить для снижения неспецифического связывания при применении *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 представлять собой «линейное антитело», *например*, как описано в патенте США № 5,641,870, *например*. Такие линейные антитела могут быть моноспецифическими

или биспецифическими.

2. Гуманизированные антитела

Настоящее изобретение 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, который не является человеком. Эти не человеческие аминокислотные остатки часто называют «импортными» остатками, которые обычно берут из «импортного» переменного домена. Гуманизация в основном может быть выполнена способом 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), путем замены последовательностей гиперпеременной области на соответствующие последовательности антитела человека. Соответственно, такие «гуманизированные» антитела представляют собой химерные антитела (патент США № 4,816,567), в которых по существу менее, чем интактный переменный домен человека, заменен соответствующей последовательностью из вида, отличных от человека. На практике, гуманизированные антитела обычно представляют собой антитела человека, в которых некоторые остатки гиперпеременной 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 иметь важное значение для снижения антигенности. В соответствии с так называемым методом «наилучшего соответствия» последовательность переменного домена антитела грызуна (*например*, мыши) подвергают скринингу против всей библиотеки известных последовательностей переменного домена человека. Последовательность человека, наиболее близкая к последовательности грызунов, 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 используется конкретный каркас, полученный из консенсусной последовательности всех антител человека конкретной подгруппы легких или тяжелых цепей. Один и тот же каркас можно использовать 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 высокого сродства к антигену и других благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели, в соответствии с одним способом, получают гуманизированные антитела в процессе анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов широко доступны и известны специалистам в данной области техники. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают вероятные трехмерные конформационные структуры выбранных кандидатных

последовательностей иммуноглобулина. Проверка этих дисплеев позволяет провести анализ вероятной роли остатков в функционировании кандидатной последовательности иммуноглобулина, *т.е.* анализ остатков, влияющих на способность кандидатного иммуноглобулина связывать свой антиген. Таким образом, остатки FR могут быть выбраны и объединены из реципиентной и импортной последовательностей так, что достигается желаемая характеристика антитела, такая как повышенная аффинность к антигену-мишени. В общем, остатки гипервариабельной области напрямую и наиболее по существу участвуют во влиянии на связывание антигена.

3. Антитела человека

Анти-Siglec-8 антитела человека по настоящему изобретению могут быть сконструированы путем комбинирования последовательности(ей) вариабельного домена клона F_v, выбранной из библиотек фагового дисплея, полученных от человека, с известной последовательность(ями) константного домена человека. Альтернативно, моноклональные анти-Siglec-8 антитела человека по настоящему изобретению могут быть получены гибридным способом. Линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека для продуцирования моноклональных антител человека описаны, например, в Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); and Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991).

Можно получить трансгенных животных (*например*, мышей), которые способны, после иммунизации, продуцировать полный репертуар антител человека в отсутствие продуцирования эндогенного иммуноглобулина. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена J-области тяжелой цепи антитела (JH) у химерных и мутантных мышей с зародышевой линией приводит к полному ингибированию продуцирования эндогенных антител. Перенос массива генов иммуноглобулина зародышевой линии человека таким мутантным мышам с зародышевой линией будет приводить к продуцированию антител человека при заражении 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 быть использована для получения антител человека из не человеческих (*например*, грызунов) антител, где антитело человека имеет сходную аффинность и специфичность с исходным не человеческим антителом. В соответствии с этим способом, который также называется «импринтинг эпитопа», вариабельная область тяжелой или легкой цепи фрагмента антитела не человеческого происхождения, полученного методами фагового дисплея, как описано в настоящем документе, заменяется репертуаром генов V-домена человека, создавая популяцию не человеческих цепей/человеческих цепей scFv или Fab химер. Отбор с использованием антигена приводит к выделению не человеческой цепи/человеческой цепи химерного scFv или Fab, где человеческая цепь восстанавливает антигенсвязывающий сайт, разрушенный при удалении соответствующей не человеческой цепи в первичном клоне фагового

дисплея, *т.е.* эпитоп управляет выбором партнера цепи человека. Когда процесс повторяют для замены оставшейся не человеческой цепи, получают антитело человека (см. РСТ WO 93/06213, опубликованную 1 апреля 1993 г.). В отличие от традиционной гуманизации не человеческих антител путем прививки CDR, этот метод позволяет получить полностью человеческие антитела, которые не имеют остатков FR или CDR не человеческого происхождения.

4. Биспецифические антитела

Биспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, обладающие специфичностью связывания как минимум с двумя различными 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, и другая относится к любому другому антигену. В некоторых вариантах осуществления, биспецифические антитела могут связываться с двумя разными эпитопами Siglec-8. Биспецифические антитела также можно использовать для локализации цитотоксических агентов в клетках, которые экспрессируют Siglec-8. Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, F(ab')₂ биспецифические антитела).

Способы получения биспецифических антител известны в данной области техники. См. Milstein and Cuello, Nature, 305: 537 (1983), WO 93/08829, опубликованную 13 мая 1993 г., и Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655 (1991). Дополнительные подробности получения биспецифических антител представлены, например, в Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986). Биспецифические антитела включают поперечно сшитые или «гетероконъюгированные» антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть сопряжено с авидином, другое с биотином. Гетероконъюгированные антитела могут быть получены с использованием любого удобного способа поперечного сшивания. Подходящие поперечно-сшивающие агенты хорошо известны в данной области техники и описаны в патенте США № 4,676,980, вместе с множеством методов поперечного сшивания.

5. Однодоменные антитела

В некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему изобретению представляет собой однодоменное антитело. Однодоменное антитело представляет собой единственную полипептидную цепь, содержащую весь или часть варибельного домена тяжелой цепи или весь или часть варибельного домена легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления, однодоменное антитело представляет собой однодоменное антитело человека (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; see, e.g., U.S. Pat. No. 6,248,516 B1). В одном варианте осуществления, однодоменное антитело состоит из всего или части варибельного домена тяжелой цепи антитела.

6. Варианты антител

В некоторых вариантах осуществления, рассматриваются модификации

аминокислотной последовательности антител, описанных в настоящем документе. Например, может быть желательным 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 замены могут быть введены в аминокислотную последовательность рассматриваемого антитела во время создания этой последовательности.

Полезный способ идентификации определенных остатков или областей антитела, которые являются предпочтительными локациями для мутагенеза, называется «аланин-сканирующим мутагенезом» как описано Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. В настоящем документе идентифицируют остаток или группу остатков-мишеней (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 локации аминокислот, которые демонстрируют функциональную чувствительность к заменам, затем уточняют путем введения дополнительных или других вариантов в или для сайтов замещения. Таким образом, в то время как сайт для введения вариации аминокислотной последовательности предопределен, природа мутации как таковой не обязательно должна быть предопределена. Например, для анализа эффективности мутации в данном сайте, проводят ala сканирование или случайный мутагенез в кодоне или области-мишени, и экспрессированные иммуноглобулины проверяют на желаемую активность.

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

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

быть получены рекомбинантными методами.

В некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему изобретению изменено 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-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, представляют собой распознающие последовательности 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 серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Добавление или делецию сайтов гликозилирования в антителе обычно осуществляют путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, что создается или удаляется одна или несколько описанных выше трипептидных последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования). Изменение также может быть выполнено путем добавления, делеции или замены одного или нескольких сериновых или треониновых остатков в последовательности исходного антитела (для сайтов O-связанного гликозилирования).

Если антитело содержит Fc область, связанный с ним углевод 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 N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) в точках ветвления 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, присоединенным 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.) касательно антигенсвязывающих молекул с модифицированным гликозилированием.

В некоторых вариантах осуществления, вариант гликозилирования содержит Fc область, где углеводная структура, присоединенная к Fc области, не содержит фукозу. Такие варианты имеют улучшенную функцию ADCC. Необязательно, Fc область дополнительно содержит одну или несколько аминокислотных замен, 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 с дефицитом фукозилирования белков (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); заявка на патент США № US 2003/0157108 A1, Presta, L; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., особенно в примере 11), и нокаутные клеточные линии, такие как ген альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8, нокаутные клетки CHO (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004) и клетки, сверхэкспрессирующие β 1,4-N-ацетилгликоминилтрансферазу III (GnT-III) и μ -маннозидазу II (ManII) Гольджи.

В настоящем описании рассматриваются антитела, которые имеют пониженное содержание фукозы по сравнению с количеством фукозы на том же самом антителе, продуцируемом в клетке CHO 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, представленное в настоящем документе анти-Siglec-8 антитело представляет собой антитело, в котором менее примерно 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% или 1% N-связанных гликанов содержат фукозу. В некоторых вариантах осуществления, представленное в настоящем документе анти-Siglec-8 антитело представляет собой антитело, в котором ни один из его N-связанных гликанов не содержит фукозу, т. е. в котором антитело полностью не содержит фукозу, или не содержит фукозу, или не фукозилировано, или афукозилировано. Количество фукозы можно определить путем расчета среднего количества фукозы в сахарной цепи на Asn297 относительно суммы всех гликоструктур, присоединенных к Asn297 (например, сложных, гибридных и высокоманнозных структур), измеренного с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF, как описано, например, в WO 2008/077546. Asn297 относится к аспарагиновому остатку, расположенному примерно в положении 297 в Fc области (нумерация Eu остатков Fc области); однако Asn297 также может быть расположен примерно на ± 3 аминокислоты выше или ниже положения 297, т.е. 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 являются не фукозилированными.

В одном варианте осуществления, антитело изменено для улучшения его периода полужизни в сыворотке. Чтобы увеличить время полужизни антитела в сыворотке, можно включить эпитоп, связывающий рецептор реутилизации, в антитело (особенно фрагмент антитела), как описано в патенте США №5,739,277, например. Используемый 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 полувыведения в сыворотке *in vivo* молекулы 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 аминокислотной замены. В этих вариантах, по меньшей мере, один аминокислотный остаток в молекуле антитела заменен другим остатком. Сайты, представляющие интерес для заместительного мутагенеза, включают гипервариабельные области, но также предполагаются изменения FR. Консервативные замены показаны в таблице 5 под заголовком «предпочтительные замены». Если такие замены приводят к желательному изменению биологической активности, тогда могут быть введены более существенные замены, обозначенные как «типичные замены» в таблице 5 или как дополнительно описано ниже в отношении классов аминокислот, и продукты должны быть подвергнуты 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 антител достигаются за счет

выбора замен, существенно различающихся по своему влиянию на сохранение (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, в виде листа или спирали, (b) заряда или гидрофобности молекулы в сайте-мишени или с) объема 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) не полярные: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) не заряженные 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: метионин, 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.

Не консервативные замены повлекут за собой замену члена одного из этих классов на другой класс. Такие замененные остатки также могут быть введены в консервативные сайты замены или в оставшиеся (не консервативные) сайты.

Один тип варианта замены включает замену одного или нескольких остатков гипервариабельной области исходного антитела (например, гуманизированного или антитела человека). Как правило, полученные варианты, отобранные для дальнейшей разработки, будут иметь модифицированные (например, улучшенные) биологические свойства по сравнению с родительским 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 получения всех возможных аминокислотных замен в каждом сайте. Антитела, полученные таким образом, представляются из нитевидных фаговых частиц в виде слияний, по меньшей мере, с частью белка оболочки фага (например, продукта гена III M13), упакованного внутри каждой частицы. Затем варианты, представленные на фаговом дисплее, подвергают скринингу на их биологическую активность (например, аффинность связывания). Чтобы идентифицировать участки гипервариабельной кандидатной области для модификации, можно провести сканирующий мутагенез (например, аланин-сканирование) для идентификации остатков гипервариабельной области, вносящих значительный вклад в связывание антигена. Альтернативно или дополнительно, может быть полезно проанализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для

определения точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами на замену в соответствии с методами, известными в данной области техники, в том числе описанными в настоящем документе. Как только такие варианты созданы, панель вариантов подвергается скринингу с использованием методов, известных в данной области техники, в том числе описанных в настоящем документе, и антитела с превосходными свойствами в одном или нескольких соответствующих анализах могут быть выбраны для дальнейшей разработки.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотной последовательности антитела, получают различными способами, известными 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, PCR мутагенеза и кассетного мутагенеза более раннего полученного варианта или не вариантной версии антитела.

Может оказаться желательным ввести одну или несколько аминокислотных модификаций в Fc область антител по настоящему изобретению, тем самым создавая вариант Fc области. Вариант Fc области может содержать последовательность Fc области человека (например, Fc область IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или нескольких аминокислотных положениях, включая положение цистеина шарнира. В некоторых вариантах осуществления, вариант Fc области содержит Fc область IgG4 человека. В другом 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 рекомендациями в данной области техники, предполагается, что в некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему изобретению может содержать одно или несколько изменений по сравнению с аналогом антитела дикого типа, например, в Fc области. Эти антитела, тем не менее, будут сохранять практически такие же характеристики, необходимые для терапевтического применения, по сравнению с их аналогами дикого типа. Например, считается, что в области Fc могут быть сделаны определенные изменения, которые приведут к изменению (т.е. либо к улучшению, либо к уменьшению) связывания C1q и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в WO 99/51642. См. также Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821; и WO 94/29351, касающиеся других примеров вариантов Fc области. WO 00/42072 (Presta) и WO 2004/056312 (Lowman) описывают варианты антител с улучшенным или пониженным связыванием с FcR. Содержание этих патентных публикаций специально включено в настоящий документ 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 Fc рецептором (FcRn), который

отвечает за перенос материнских IgG к плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) и Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), описаны в US 2005/0014934 A1 (Hinton et al.). Эти антитела содержат Fc область с одной или несколькими заменами, которые улучшают связывание Fc области с FcRn. Варианты полипептидов с измененными аминокислотными последовательностями Fc области и повышенной или пониженной способностью связывания C1q описаны в патенте США №6194551B1, 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, кодирующую его нуклеиновую кислоту выделяют и встраивают в реплицируемый вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии. ДНК, кодирующую антитело, легко выделяют и секвенируют с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела). Доступно множество векторов. Выбор вектора частично зависит от используемой клетки-хозяина. Как правило, клетки-хозяева имеют либо прокариотическое, либо эукариотическое (как правило, от млекопитающих) 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 человека или животного любого вида.

Получение антител с использованием прокариотических клеток-хозяев:

а) Конструирование вектора

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные компоненты антитела по настоящему изобретению, 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 PCR. После получения, последовательности, кодирующие полипептиды, вставляют в рекомбинантный вектор, способный к репликации и экспрессии гетерологичных полинуклеотидов в прокариотических хозяевах. Многие векторы, которые доступны и известны в данной области техники, можно использовать для целей настоящего описания. Выбор подходящего вектора будет зависеть главным образом от размера нуклеиновых кислот, которые должны быть вставлены в вектор, и от конкретной клетки-хозяина, которую нужно трансформировать вектором. Каждый вектор содержит различные компоненты, в зависимости от его функции (амплификация или экспрессия гетерологичного полинуклеотида, или и то, и другое) и его совместимости с конкретной клеткой-хозяином, в которой он находится. Компоненты вектора обычно включают, но не ограничены ими: точку начала репликации, маркерный ген селекции, промотор, сайт связывания рибосом

(RBS), сигнальную последовательность, вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты и последовательность терминации транскрипции.

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

Кроме того, фаговые векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, совместимые с микроорганизмом-хозяином, могут быть использованы в качестве трансформирующих векторов в связи с этими хозяевами. Например, бактериофаг, такой как λ GEM.TM.-11, можно использовать для создания рекомбинантного вектора, который можно использовать для трансформации восприимчивых 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. Промотор представляет собой нетранслируемую регуляторную последовательность, расположенную выше (5') к цистрону, который модулирует ее экспрессию. Прокариотические промоторы обычно делятся на два класса: индуцибельные и конститутивные. Индуцибельный промотор представляет собой промотор, который инициирует повышенные уровни транскрипции цистрона под его контролем в ответ на изменения условий культивирования, например присутствие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры.

Хорошо известно большое количество промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами. Выбранный промотор можно функционально связать с ДНК цистрона, кодирующей легкую или тяжелую цепь, путем удаления промотора из исходной ДНК посредством расщепления рестрикционными ферментами и встраивания выделенной последовательности промотора в вектор по настоящему описанию. И нативную промоторную последовательность, и множество гетерологичных промоторов можно использовать для направления амплификации и/или экспрессии генов-мишеней. В некоторых вариантах осуществления, используются гетерологичные промоторы, поскольку они обычно обеспечивают более высокую транскрипцию и более высокие выходы экспрессированного гена-мишени по сравнению с промотором нативного

полипептида-мишени.

Промоторы, подходящие для использования с прокариотическими хозяевами, включают промотор PhoA, промоторные системы β -галактамазы и лактозы, промоторную систему триптофана (*trp*) и гибридные промоторы, такие как промотор *tac* или *trc*. Однако, другие промоторы, которые являются функциональными в бактериях (например, другие известные бактериальные или фаговые промоторы), также подходят. Их нуклеотидные последовательности были опубликованы, что позволяет специалисту в данной области техники функционально лигировать их с цистронами, кодирующими легкие и тяжелые цепи мишени (Siebenlist et al. (1980) *Cell* 20: 269), используя линкеры или адаптеры для обеспечения любых необходимых сайтов рестрикции.

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

В другом аспекте, продуцирование иммуноглобулинов в соответствии с настоящим описанием может происходить в цитоплазме клетки-хозяина и, следовательно, не требует присутствия последовательностей сигнала секреции в каждом цистроне. В связи с этим, легкие и тяжелые цепи иммуноглобулина экспрессируются, складываются и собираются с образованием функциональных иммуноглобулинов в цитоплазме. Определенные штаммы-хозяева (например, штаммы *E. coli* *trxB*) обеспечивают условия цитоплазмы, благоприятные для образования дисульфидных связей, тем самым обеспечивая правильное сворачивание и сборку экспрессируемых белковых субъединиц. Proba and Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

Антитела по настоящему изобретению также могут быть получены с использованием системы экспрессии, в которой можно модулировать количественное соотношение экспрессируемых полипептидных компонентов, чтобы максимизировать выход секретлируемых и надлежащим образом собранных антител по настоящему изобретению. Такое модулирование достигается, по меньшей мере частично, одновременным модулированием силы трансляции для полипептидных компонентов.

Один метод модулирования силы трансляции описан в Simmons et al., патент США № 5,840,523. Он использует варианты области инициации трансляции (TIR) внутри цистрона. Для данного TIR можно создать серию вариантов последовательностей аминокислот или нуклеиновых кислот с диапазоном сил трансляции, тем самым обеспечивая удобные средства для корректировки этого фактора для желаемого уровня экспрессии конкретной цепи. Варианты TIR могут быть созданы обычными методами мутагенеза, которые приводят к изменениям кодонов, которые могут изменить аминокислотную последовательность. В некоторых вариантах осуществления, изменения в нуклеотидной последовательности являются молчащими. Изменения в TIR могут включать, например, изменения количества или интервалов между последовательностями Шайна-Дальгарно, наряду с изменениями в сигнальной последовательности. Одним из способов получения мутантных сигнальных последовательностей является создание «банка кодонов» в начале кодирующей последовательности, который не изменяет аминокислотную последовательность сигнальной последовательности (т. е. изменения являются молчащими). Этого можно достигнуть изменением положения третьего 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 метод мутагенеза подробно описан у Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158.

В одном варианте осуществления, создается ряд векторов с диапазоном сил TIR для каждого цистрона в нем. Этот ограниченный ряд обеспечивает сравнение уровней экспрессии каждой цепи, а также выход желаемых продуктов антител при различных комбинациях сил TIR. Силы TIR могут быть определены путем количественного определения уровня экспрессии репортерного гена, как подробно описано Simmons et al. патент США № 5,840,523. На основании сравнения силы трансляции выбирают желаемые отдельные TIR для объединения в конструкциях вектора экспрессии по настоящему изобретению.

Прокариотические клетки-хозяева, подходящие для экспрессии антител по настоящему изобретению, 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 по настоящему изобретению. 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; депозит ATCC № 27,325) и его производные, включая штамм 33D3, имеющий генотип W3110 Δ*hnuA* (Δ*tonA*) *ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-fepE) degP41 kanR* (патент США № 5,639,635). Другие штаммы и их производные, такие как E.coli 294 (ATCC 31,446), E.coli

В, *E.coli*λ 1776 (ATCC 31,537) и *E.coli* RV308 (ATCC 31,608), также подходят. Эти примеры являются иллюстративными, а не ограничивающими. Способы конструирования производных любой из вышеупомянутых бактерий, имеющих определенные генотипы, известны в данной области техники и описаны, например, в Bass et al., *Proteins*, 8:309-314 (1990). Как правило, необходимо выбрать соответствующие бактерии, принимая во внимание реплицируемость репликона в клетках бактерии. Например, виды *E. coli*, *Serratia* или *Salmonella* могут быть подходящим образом использованы в качестве хозяина, когда для доставки репликона используются хорошо известные плазмиды, такие как pBR322, pBR325, pACYC177 или pKN410. Как правило, клетка-хозяин должна секретировать минимальные количества протеолитических ферментов, и в клеточную культуру желательно включать дополнительные ингибиторы протеазы.

б) Продуцирование антител

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

Трансформация означает введение ДНК в прокариотического хозяина таким образом, чтобы ДНК могла реплицироваться либо как внехромосомный элемент, либо как хромосомный интегрант. В зависимости от используемой клетки-хозяина, трансформацию проводят с использованием стандартных методов, подходящих для таких клеток. Обработка кальцием с использованием хлорида кальция обычно используется для бактериальных клеток, которые содержат существенные барьеры клеточной стенки. В другом способе трансформации используется полиэтиленгликоль/ДМСО. Еще одним используемым методом является электропорация.

Прокариотические клетки, используемые для получения полипептидов по настоящему описанию, выращивают в среде, известной в данной области техники и подходящей для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры подходящих сред включают среду Лурия (LB) плюс необходимые питательные добавки. В некоторых вариантах осуществления, среда также содержит агент селекции, выбранный на основе конструкции вектора экспрессии, для селективного обеспечения роста 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 неорганических фосфатов также могут быть включены в соответствующих концентрациях, вводимых 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, дитиоэритритола и дитиотрейтола.

Прокариотические клетки-хозяева культивируют при подходящих температурах. В некоторых вариантах осуществления, для роста *E.coli*, температура роста находится в

диапазоне 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 в диапазоне от примерно 5 до примерно 9, в основном, в зависимости от организма-хозяина. В некоторых вариантах осуществления, для *E. coli* pH составляет от примерно 6,8 до примерно 7,4 или примерно 7,0.

Если в векторе экспрессии по настоящему изобретению используется индуцируемый промотор, экспрессия белка индуцируется в условиях, подходящих для активации промотора. В одном аспекте настоящего изобретения, промоторы *RhoA* используются для контроля транскрипции полипептидов. Соответственно, трансформированные клетки-хозяева культивируют в фосфатам-ограничивающей среде для индукции. В некоторых вариантах осуществления, фосфат-ограничивающая среда представляет собой среду C.R.A.P. (см., например, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Можно использовать множество других индукторов в соответствии с используемой векторной конструкцией, как известно в данной области техники.

В одном варианте осуществления, экспрессированные полипептиды по настоящему изобретению секретируются в и восстанавливаются из периплазмы клеток-хозяев. Восстановление белка обычно включает разрушение микроорганизма, как правило, такими средствами, как осмотический шок, обработка ультразвуком или лизис. После разрушения клеток, клеточный дебрис или цельные клетки можно удалить центрифугированием или фильтрованием. Белки могут быть дополнительно очищены, например, хроматографией на аффинной смоле. Альтернативно, белки могут быть перенесены в культуральную среду и выделены из нее. Клетки могут быть удалены из культуры, и супернатант культуры фильтруют и концентрируют для дальнейшей очистки полученных белков. Экспрессированные полипептиды могут быть дополнительно выделены и идентифицированы с использованием общеизвестных способов, таких как электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE) и вестерн-блоттинг.

В одном аспекте настоящего описания, продуцирование антител проводят в больших количествах в процессе ферментации. Для продуцирования рекомбинантных белков доступны различные крупномасштабные процедуры периодической ферментации с добавлением субстрата. Объем крупномасштабной ферментации составляет, по меньшей мере, 1000 литров, и в некоторых вариантах осуществления, от примерно 1000 до 100000 литров. Эти ферментеры используют лопастные мешалки для распределения кислорода и питательных веществ, особенно глюкозы. Ферментация в малом масштабе обычно относится к ферментации в ферментере, объемная емкость которого не превышает примерно 100 литров, и может варьироваться от примерно 1 литра до примерно 100 литров.

В процессе ферментации, индукция экспрессии белка обычно инициируется после того, как клетки выращены в подходящих условиях до желаемой плотности, например, OD550 примерно 180-220, при которой клетки находятся в ранней стационарной фазе. В соответствии с используемой векторной конструкцией, можно использовать различные индукторы, известные в данной области техники и описанные выше. Клетки можно

выращивать в течение более коротких периодов до индукции. Клетки обычно индуцируют в течение примерно 12-50 часов, хотя можно использовать большее или меньшее время индукции.

Для повышения выхода продуцирования и качества полипептидов по настоящему изобретению, можно модифицировать различные условия ферментации. Например, для улучшения правильной сборки и укладки секретируемых полипептидов антител, дополнительные векторы, сверхэкспрессирующие белки теплового шока, такие как белки Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD и/или DsbG) или FkpA (пептидилпролил цис, транс-изомераза с активностью белка теплового шока) можно использовать для совместной трансформации прокариотических клеток-хозяев. Было продемонстрировано, что белки теплового шока облегчают правильную укладку и растворимость 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 свести к минимуму протеолиз экспрессированных гетерологичных белков (особенно тех, которые являются протеолитически чувствительными), для настоящего описания можно использовать определенные штаммы-хозяева, дефицитные по протеолитическим ферментам. Например, штаммы клеток-хозяев могут быть модифицированы для осуществления генетической мутации(ий) 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 дефицитные по протеазе штаммы *E. coli* 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* с дефицитом протеолитических ферментов и трансформированные плазмидами, сверхэкспрессирующими один или несколько белков теплового шока, используют в качестве клеток-хозяев в системе экспрессии по настоящему изобретению.

с) Очистка антител

В одном варианте осуществления, белок антитела, полученный в настоящем документе, подвергают дополнительной очистке с получением препаратов, которые являются по существу гомогенными для дальнейших анализов и применения. Можно использовать стандартные способы очистки белка, известные в данной области техники. Следующие процедуры являются примерами подходящих процедур очистки: фракционирование на иммуноаффинных или на ионообменных колонках, осаждение этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматография на силикагеле 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. Белок А представляет собой белок клеточной стенки размером 41 кД из *Staphylococcus aureus*, который с высокой аффинностью связывается с Fc областью антител. Lindmark et al (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13. Твердая фаза, на которой иммобилизован белок А, может представлять собой колонку, содержащую поверхность из стекла или диоксида кремния, или стеклянную колонку с контролируемым размером пор, или колонку с кремниевой кислотой. В некоторых случаях, колонка покрыта реагентом, например глицерином, для возможного предотвращения неспецифического прилипания загрязняющих веществ.

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

Создание антител с использованием эукариотических клеток-хозяев:

Вектор для применения в эукариотической клетке-хозяине обычно включает 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 применения в эукариотической клетке-хозяине может также содержать сигнальную последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на N-конце представляющего интерес зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность может распознаваться и процессироваться (т.е. расщепляться сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. При экспрессии клеток млекопитающих, доступны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидеры, например, сигнал gD простого герпеса. ДНК такой области-предшественника лигируют в рамке считывания с ДНК, кодирующей антитело.

б) Точка начала репликации

Как правило, для векторов экспрессии млекопитающих компонент точки начала репликации не требуется. Например, происхождение 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 селективируемым маркером. Типовые гены селекции кодируют белки, которые (а) придают резистентность к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (б) восполняют дефицит ауксотрофов, где это уместно, или (с) поставляют важные питательные вещества,

недоступные из сложных сред.

В одном примере схемы селекции используется лекарственное средство для остановки роста клетки-хозяина. Те клетки, которые успешно трансформируются гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий лекарственную резистентность, и, таким образом, выживают в режиме селекции. Примеры такой доминантной селекции используют лекарственные средства неомицин, микофеноловую кислоту и гигромицин.

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

Например, в некоторых вариантах осуществления, клетки, трансформированные геном селекции DHFR, сначала идентифицируют путем культивирования 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 совместно трансформированные с последовательностями ДНК, кодирующими антитело, белок DHFR дикого типа и другой селективируемый маркер, такой как аминокликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), могут быть выбраны посредством выращивания клеток в среде, содержащей агент для селекции селективируемого маркера, такой как аминокликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418. См. пат. № 4,965,199. Клетки-хозяева могут включать NS0, CHOK1, CHOK1SV или их производные, включая клеточные линии с дефицитом глутаминсинтетазы (GS). Способы применения GS в качестве селективируемого маркера 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 представляющий интерес полипептид (например, антитело). Промоторные последовательности известны для эукариотов. Например, практически все эукариотические гены имеют АТ-насыщенную область, расположенную примерно на 25-30 нуклеотидов выше по течению от сайта, где иницируется транскрипция. Другая последовательность, обнаруженная на 70-80 оснований выше начала транскрипции многих генов, представляет собой область CNCAAT, где N может быть любым нуклеотидом. На 3' конце большинства эукариотических генов находится последовательность AATAAA, которая может быть сигналом для добавления поли А хвоста к 3' концу кодирующей последовательности. В некоторых вариантах

осуществления, любая или все эти последовательности могут быть надлежащим 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 кур, аденовирус (такой как аденовирус 2), папилломавирус крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и вирус 40 обезьян (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 удобно получать в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит точку начала репликации вируса SV40. Немедленно ранний промотор цитомегаловируса человека удобно получать в виде рестрикционного фрагмента HindIII E. Система для экспрессии ДНК в хозяевах-млекопитающих с использованием папилломавируса 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), описывающую экспрессию кДНК β -интерферона человека в клетках мыши под контролем промотора тимидинкиназы 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 усиливается путем вставки энхансерной последовательности в вектор. Многие энхансерные последовательности в настоящее время известны из генов млекопитающих (глобин, эластаза, альбумин, α -фетопроtein и инсулин). Однако обычно используют энхансер из вируса эукариотической клетки. Примеры включают энхансер SV40 на поздней стороне точки начала репликации (п.н. 100-270), 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 описываются энхансерные элементы для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть сплайсирован в векторе в положении 5' или 3' по отношению к последовательности, кодирующей полипептид антитела, но, как правило, расположен в 5' конце от промотора.

ф) Компонент терминации транскрипции

Векторы экспрессии, используемые в эукариотических клетках-хозяевах, могут также содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации иРНК. Такие последовательности обычно доступны из 5' и иногда 3' нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти участки содержат нуклеотидные сегменты, транскрибированные в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части иРНК, кодирующей антитело. Одним из полезных компонентов терминации транскрипции является область полиаденилирования гормона

роста крупного рогатого скота. См. WO 94/11026 и описанный в ней вектор экспрессии.

g) Селекция и трансформация клеток-хозяев

Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторах, описанных 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 почек обезьяны CV1, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия почки эмбриона человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клетки почек детенышей хомячков (ВНК, 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 собак (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени серой крысы (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого 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 МРЦ 5; клетки FS4; клетки СНОК1, клетки СНОК1SV или их производные и линия гепатомы человека (Hep G2).

Клетки-хозяева трансформированы описанными выше векторами экспрессии или клонирования для продуцирования антитела, и культивированы в обычных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индуцирования промоторов, селекции трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности.

h) Культивирование клеток-хозяев

Клетки-хозяева, используемые для продуцирования антитела по настоящему изобретению, можно культивировать в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как Ham's F10 (Sigma), минимальная поддерживающая среда ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная по Дульбекко среда Игла ((DMEM), Sigma), подходят для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, любая из сред, описанных в Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), патенты США №№ 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; или 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; или патент США Re. 30,985 можно использовать в качестве питательной среды для клеток-хозяев. Любая из этих сред при необходимости может быть дополнена гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как лекарственное средство GENTAMYCIN™), микроэлементами (определяемые как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в

микромольном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые известны специалистам в данной области. Условия культивирования, такие как температура, рН и подобные, такие же, которые использовались ранее с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии, и они очевидны для обычного специалиста в данной области техники.

i) Очистка антитела

При использовании рекомбинантных методов, антитело может быть получено внутриклеточно или непосредственно секретировано в среду. Если антитело продуцируется внутриклеточно, то на первой стадии частицы дебриса, либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты, могут быть удалены, например, центрифугированием или ультрафильтрацией. Когда антитело секретируется в среду, супернатанты из таких систем экспрессии могут быть сначала сконцентрированы с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрирования белков, например, установки для ультрафильтрации Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеазы, такой как PMSF, может быть включен на любой из вышеперечисленных стадий для ингибирования протеолиза, и антибиотики могут быть включены для предотвращения роста адвентиционных посторонних веществ.

Композиция антител, полученная из клеток, может быть очищена с использованием, например, хроматографии на гидроксилатапате, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, где аффинная хроматография является удобной методикой. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изоформа любого Fc домена иммуноглобулина, присутствующего в антителе. Белок А можно использовать для очистки антител, основанных на тяжелых цепях $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ человека (Lindmark et al., J. Immunol. Methods 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендуется для всех 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 регулируемыми порами или поли(стиролдивинил)бензол, обеспечивают более высокую скорость потока и более короткое время обработки, чем при использовании агарозы. Когда антитело содержит домен СН3, для очистки можно использовать смолу Bakerbond ABX™ (JT Baker, Phillipsburg, NJ). Также доступны другие методы очистки белка, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, ВЭЖХ с обращенной фазой, хроматография на силикагеле, хроматография на гепарине SEPHAROSE™, хроматография на анионообменной или катионообменной смоле (такой как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE и преципитация сульфатом аммония, в зависимости от восстанавливаемого антитела.

После любой стадии(ий) предварительной очистки, смесь, содержащая представляющее интерес антитело и примеси, может быть подвергнута дальнейшей очистке, например, с помощью хроматографии с гидрофобным взаимодействием при

низком pH с использованием элюирующего буфера при pH примерно 2,5-4,5, проводимой при низкой концентрации соли (например, примерно 0-0,25 М соли).

В общем, различные методологии получения антител для использования в исследованиях, тестировании и клиническом применении, хорошо известные в данной области техники, согласуются с вышеописанными методологиями и/или считаются подходящими специалистом в данной области техники для конкретного представляющего интерес антитела.

Продуцирование не фукозилированных антител

В настоящем документе представлены способы получения антител с пониженной степенью фукозилирования. Например, рассматриваемые в настоящем документе способы включают, но не ограничены ими, использование клеточных линий с дефицитом фукозилирования белков (например, клеток Lec13 CHO, клеток CHO с нокаутом гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы, клеток, сверхэкспрессирующих β 1,4-N-ацетилгликоминилтрансферазу III и дополнительно сверхэкспрессирующих μ -маннозидазу II Гольджи и т.д.), и добавление аналога(ов) фукозы в среду для культивирования клеток, используемую для продуцирования антител. См. Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); заявку 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 α -глюкозидазу I, α -глюкозидазу II и α -маннозидазу I. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор гликозидазы представляет собой ингибитор α -маннозидазы I (например, кифунензин).

Используемый в настоящем документе термин «фукозилирование ядра» относится к присоединению фукозы («фукозилированию») к N-ацетилглюкозамину («GlcNAc») на восстанавливаемом конце N-связанного гликана. Также представлены антитела, продуцируемые такими способами, и их композиции.

В некоторых вариантах осуществления, снижается фукозилирование сложных N-гликозид-связанных сахарных цепей, связанных с Fc областью (или доменом). Используемая в настоящем документе «сложная N-гликозид-связанная сахарная цепь» обычно связана с аспарагином 297 (в соответствии с нумерацией Kabat), хотя сложная N-гликозид-связанная сахарная цепь также может быть связана с другими аспарагиновыми остатками. «Сложная N-гликозид-связанная сахарная цепь» исключает тип сахарной цепи с высоким содержанием маннозы, в котором только манноза включена в не восстанавливающий конец структуры ядра, но включает 1) сложный тип, в котором не восстанавливающая концевая сторона структуры ядра имеет одну или несколько ветвей галактозо-N-ацетилглюкозамина (также называемых «gal-GlcNAc»), и не

восстанавливающая концевая сторона Gal-GlcNAc необязательно содержит сиаловую кислоту, разделяющую N-ацетилглюкозамин пополам, или подобное; или 2) гибридный тип, в котором восстанавливающая концевая сторона структуры ядра имеет обе ветви N-гликозид-связанной сахарной цепи с высоким содержанием маннозы, и сложной N-гликозид-связанной сахарной цепи.

В некоторых вариантах осуществления, «сложная N-гликозид-связанная сахарная цепь» включает сложный тип, в котором восстанавливающая концевая сторона структуры ядра имеет ноль, одну или несколько ветвей галактозо-N-ацетилглюкозамина (также называемых «gal-GlcNAc»), и восстанавливающая концевая сторона Gal-GlcNAc необязательно, дополнительно имеет структуру, такую как сиаловая кислота, разделяющую пополам N-ацетилглюкозамин, или подобное.

В соответствии с настоящими способами, как правило, только незначительное количество фукозы включается в сложную N-гликозид-связанную сахарную цепь(и). 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 примерно 5% или менее примерно 1% антител имеют фукозилирование ядра фукозой в композиции. В некоторых вариантах осуществления, практически ни одно (т.е. менее примерно 0,5%) антитело не имеет фукозилированного 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% антител являются не фукозилированными в композиция.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлено антитело, в котором практически ни одна (т.е. менее примерно 0,5%) N-гликозид-связанных углеводных цепей не содержит фукозный остаток. В некоторых вариантах осуществления, в настоящем документе представлено антитело, в котором, по меньшей мере, одна или две тяжелые цепи антитела не являются фукозилированными.

Как описано выше, для экспрессии антитела можно использовать различные системы экспрессионных векторов-хозяев млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления, в культуральную среду не добавляют фукозу. В некоторых вариантах осуществления, в культуральную среду добавляют эффективное количество аналога фукозы. В этом контексте «эффективное количество» относится к количеству аналога, достаточному для уменьшения включения фукозы в сложную N-гликозид-связанную сахарную цепь антитела, по меньшей мере, примерно на 10%, по меньшей мере, примерно на 20%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40% или по меньшей мере, примерно на 50%. В некоторых вариантах осуществления, антитела, полученные с помощью способов по настоящему изобретению, 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% не ядерного фукозилированного белка (например, в них отсутствует фукозилирование ядра) по сравнению с антителами, полученными из клеток-хозяев, культивируемых в отсутствие аналога фукозы.

Содержание (например, соотношение) сахарных цепей, в которых фукоза не связана с N-ацетилглюкозамином на восстанавливающем конце сахарной цепи, по сравнению с сахарными цепями, в которых фукоза связана с N-ацетилглюкозамином на восстанавливающем конце сахарной цепи, можно определить, например, как описано в примерах. Другие способы включают гидразинолиз или ферментативное расщепление (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 и затем отделение меченой сахарной цепи хроматографией. Кроме того, композицию высвобождаемых сахарных цепей можно определить путем анализа цепей методом НРАЕС-PAD (см., например, *J. Liq Chromatogr.* 6:1557 (1983)). (См. в основном 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 анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе, где указанное антитело содержит Fc область и N-гликозид-связанные углеводные цепи, связанные с Fc областью, где менее примерно 50% N-гликозид-связанных углеводных цепей содержат фукозный остаток. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит Fc область и N-гликозид-связанные углеводные цепи, связанные с Fc областью, где менее примерно 45%, примерно 40%, примерно 35%, примерно 30%, примерно 25%, примерно 20%, или примерно 15% N-гликозид-связанных углеводных цепей содержат фукозный остаток. В некоторых аспектах, в настоящем документе представлена композиция, содержащая анти-Siglec-8 антитело, описанное в настоящем документе, где указанное антитело содержит Fc область и N-гликозид-связанные углеводные цепи, связанные с Fc областью, где по существу ни одна из N-гликозид-связанных углеводных цепей 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 являются не токсичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях, и включают буферы, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту, метионин, витамин E,

метабисульфит натрия; консерванты, изотонические вещества, стабилизаторы, комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); хелатирующие агенты, такие как ЭДТК и/или неионные поверхностно-активные вещества.

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

Консерванты могут быть добавлены для предотвращения роста микробов, и обычно они присутствуют в диапазоне от примерно 0,2% - 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, повышающие 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», поскольку они могут взаимодействовать с заряженными группами боковых цепей аминокислот, тем самым уменьшая возможность меж- и внутримолекулярных взаимодействий. Агенты, регулирующие тоничность, могут присутствовать в любом количестве от примерно 0,1% до примерно 25% масс. или от примерно 1 до примерно 5% масс., 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 следующих: (1) наполнители, (2) усилители растворимости, (3) стабилизаторы и (4) агенты, предотвращающие денатурацию или прилипание к стенке контейнера. Такие эксципиенты включают: многоатомные сахарные спирты (перечислены 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, миониситоza, миоинизит, галактоза, галактит, глицерин, циклиты (например, инозит), полиэтиленгликоль; серосодержащие восстанавливающие агенты, такие как мочевины, глутатион, липоевая кислота, тиогликолят натрия, тиоглицерин, α -монотиоглицерин и тиосульфат натрия;

низкомолекулярные белки, такие как сывороточный альбумин человека, сывороточный альбумин крупного рогатого скота, 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 составу подвергаться поверхностному напряжению 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 гидрированное касторовое масло 10, 50 и 60, моностеарат глицерина, эфир сахарозы и жирной кислоты, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу. Анионные детергенты, которые можно использовать, включают лаурилсульфат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия и диоктилсульфонат натрия. Катионные детергенты включают хлорид бензалкония или хлорид бензетония.

Для того чтобы составы можно было использовать для введения *in vivo*, они должны быть стерильными. Композицию можно сделать стерильной путем фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны. Терапевтические композиции по настоящему изобретению обычно помещают в контейнер, имеющий стерильный порт доступа, например, пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой 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 образом, например, путем инъекции или инфузии подкожно, внутривенно, внутривентриально, внутримышечно, внутриартериально, внутриочагово или внутрисуставно, местным введением, ингаляцией или средствами отложенного высвобождения или пролонгированного высвобождения. В некоторых вариантах осуществления, композицию или антитело по настоящему изобретению вводят внутривенной инфузией один раз в месяц в течение 3 или более месяцев.

Состав по настоящему изобретению может также содержать более одного

активного соединения, если это необходимо для лечения конкретного показания, предпочтительно, соединения с комплементарной активностью, которые не оказывают неблагоприятное воздействие друг на друга. Такие активные соединения обычно присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для намеченной 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 по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, индивидуумом является человек.

Готовое изделие или набор может дополнительно содержать контейнер. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы (например, двухкамерные флаконы), шприцы (такие как однокамерные 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 содержать этикетку или листок-вкладыш, которые находятся на контейнере или связаны с ним, могут содержать указания по восстановлению и/или применению состава. На этикетке или листке-вкладыше может быть дополнительно указано, что состав полезен или предназначен для подкожного, внутривенного или других способов введения для лечения и/или профилактики заболевания или нарушения по настоящему изобретению у индивидуума. Контейнер, содержащий состав, может быть одноразовым или многоразовым флаконом, что позволяет повторно вводить восстановленный состав. Готовое изделие или набор могут дополнительно содержать второй контейнер, содержащий подходящий разбавитель. Готовое изделие или набор могут дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой, терапевтической и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и листки-вкладыши с инструкциями по применению.

В конкретном варианте осуществления, в настоящем изобретении представлены наборы для введения одной дозы. Такие наборы включают контейнер с водным составом терапевтического антитела, включая предварительно заполненные шприцы с одной или несколькими камерами. Типовые предварительно заполненные шприцы доступны от Vetter GmbH, Ravensburg, Germany.

В другом варианте осуществления, в настоящем документе представлено готовое изделие или набор, содержащий составы, описанные в настоящем документе, для введения в автоматический медицинский шприц. Автоматический медицинский шприц можно описать как устройство для инъекции, которое после активации доставляет свое содержимое без дополнительных необходимых действий со стороны пациента или вводящего. Он особенно подходит для самовведения терапевтических составов, когда скорость доставки должна быть постоянной, и время доставки превышает несколько

мгновений.

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 изобретению.

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

ПРИМЕРЫ

Настоящее описание будет более полно понято со ссылкой на следующие примеры. Однако примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем документе, предназначены только для иллюстративных целей, и что различные модификации или изменения в свете этого будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в суть и содержание этой заявки и объем прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1: Результаты фазы 2 исследования по оценке безопасности и переносимости лечения анти-Siglec-8 антителами у пациентов с эозинофильным гастритом и/или эозинофильным гастроэнтеритом

В этом примере описаны результаты фазы 2 исследования лечения пациентов с эозинофильным гастритом (EG) и/или эозинофильным гастроэнтеритом (EGE) с использованием гуманизированного, не фукозилированного IgG1 моноклонального анти-Siglec-8 антитела (НЕКА). В частности, в этом исследовании оценивалась безопасность и переносимость анти-Siglec-8 антитела у пациентов с EG и/или EGE.

EG и/или EGE представляют собой редкий тип эозинофильного желудочно-кишечного расстройства и характеризуются хроническим воспалением из-за очаговой или диффузной инфильтрации эозинофилов в слои желудка (EG) или желудка и тонкой кишки (EGE) (Prussin, C. (2014) *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 43:317-327; Reed, C. et al. (2015) *Dig. Liver Dis.* 47:197-201; Zhang, M. and Li, Y. (2017) *J. Gastroenterol. Hepatol.* 32:64-72). Диагноз ставится на основании клинических проявлений (желудочно-кишечных симптомов) в сочетании с увеличением эозинофилов ткани в биоптатах желудка и двенадцатиперстной кишки без какой-либо другой причины эозинофилии. Считается, что желудочно-кишечные симптомы связаны с высвобождением медиаторов воспаления из активированных эозинофилов и, возможно, тучных клеток, и могут варьироваться в зависимости от слоя и/или локализации эозинофильного инфильтрата в желудочно-кишечном тракте. Симптомы обычно включают тошноту, рвоту, боль в животе, диарею, вздутие живота, раннее чувство насыщения и потерю веса (Alhmod, T. et al. (2016) *Dig. Dis. Sci.* 61:2585-2592; Lopez-Medina, G. et al. (2015) *Case Rep. Gastrointest. Med.* 2015:1-5;

Mansoor, E. et al. (2017) Clin. Gastroenterol. Hepatol. 15:1733-1741; Reed, C. et al. (2015) Dig. Liver Dis. 47:197-201). Распространенность EG и EGE оценивается в 6,3/100000 и 8,4/100000, соответственно, для пациентов в возрасте от 1 до 64 лет (Jensen, E. et al. (2016) J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 62:36-42). Общая распространенность EG оценивается как 5,1/100000 человек (Mansoor, E. et al. (2017) Clin. Gastroenterol. Hepatol. 15:1733-1741).

Не существует одобренных FDA методов лечения EG и/или EGE. Текущие терапии и методы лечения заболевания включают ингибиторы протонной помпы, антигистаминные препараты, ограниченную/элементарную диету, системные или пероральные кортикостероиды, и периодическое использование иммуномодулирующих биологических препаратов не по прямому назначению. Ингибиторы протонной помпы практически не приносят пользы у пациентов с EG и/или EGE, хотя частичную пользу можно наблюдать у пациентов с эозинофильным эзофагитом (Katz, P. et al. (2013) Am. J. Gastroenterol. 108:308-328). Ограниченная/элементарная диета не считается подходящей для длительного лечения и используется в большей степени для обеспечения питания, несмотря на сохраняющиеся симптомы. Кортикостероиды, системные или пероральные, могут облегчить симптомы, но не являются решением для длительного лечения из-за их многочисленных побочных эффектов.

Siglec-8 имеет ограниченное распределение в тканях, экспрессируется селективно на поверхности эозинофилов, тучных клеток и, на более низких уровнях, на базофилах. Связывание анти-Siglec-8 антитела с Siglec-8 индуцирует сигнал, который подавляет активацию тучных клеток и может приводить к апоптозу эозинофилов. В присутствии эффекторных клеток (таких как естественные киллеры), анти-Siglec-8 антитело, связывающееся с Siglec-8, истощает циркулирующие эозинофилы за счет антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). Не желая быть связанными теорией, этот профиль активности может обеспечить клиническую пользу при заболеваниях, в которых играют роль эти типы клеток, таких как эозинофильный гастрит (EG) и/или эозинофильный гастроэнтерит (EGE).

Дизайн исследования

Это исследование представляет собой метод произвольного выбора в условиях двойной анонимности с контролем по плацебо. У пациентов, включенных в исследование, наблюдались умеренные и тяжелые симптомы EG и/или EGE. Все пациенты сообщили о среднем еженедельном балле ≥ 3 (по шкале от 0 до 10), зарегистрированном для боли в животе, диареи и/или тошноты в опроснике результатов лечения по оценке пациента (PRO), в течение, по меньшей мере, 2 из 3 недель сбора PRO. Каждую квалификационную неделю заполняли минимум четыре опросника.

Кроме того, у всех пациентов либо потерпели неудачу, либо симптомы заболевания не контролировались должным образом стандартными методами лечения симптомов EG/EGE, которые могли включать, среди прочего, ингибиторы протонной помпы (PPI), системные или местные кортикостероиды и/или диету.

Кроме того, у каждого пациента был подтвержден EG и/или EGE с помощью

эзофагогастродуоденоскопии (ЭГДС), который определялся эозинофилией слизистой оболочки желудка (≥ 30 эозинофилов/HPF в 5 HPF) и/или эозинофилией слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки (≥ 30 эозинофилов/HPF в 3 HPF) по ЭГДС, выполненной в период скрининга, без какой-либо другой причины желудочной эозинофилии (например, паразитарной или другой инфекции или злокачественного новообразования). Для получения дополнительной информации см. ClinicalTrials.gov Identifier NCT03496571.

65 пациентов были включены в 3 группы. В первой группе 22 пациента получали анти-Siglec-8 антитело (не фукозилированное IgG1 антитело НЕКА) в следующих дозах: 0,3 мг/кг для первой дозы и 1,0 мг/кг для второй, третьей и четвертой доз («низкая доза»). Во второй группе 22 пациента получали анти-Siglec-8 антитело в следующих дозах: 0,3 мг/кг для первой дозы, 1,0 мг/кг для второй дозы и 3,0 мг/кг для третьей и четвертой доз («высокая доза»). Пациенты в третьей группе получали плацебо. Все дозы вводили ежемесячно.

Первичной конечной точкой была доля изменения эозинофилов на HPF, наблюдаемая в биоптатах ЖКТ до и после лечения или плацебо. Среднюю долю изменения числа эозинофилов рассчитывали путем сравнения числа эозинофилов на 14-й неделе лечения с исходным числом.

Вторичные конечные точки включали долю ответивших на лечение и изменение симптомов по данным опросника PRO (в обоих случаях сравнивали 13-14 неделю с исходным уровнем), а также исследовательскую оценку сопутствующего эозинофильного эзофагита (ЕоЕ). Симптомы, указанные в опроснике PRO, включали боль в животе, тошноту, диарею, рвоту, чувство насыщения перед окончанием приема пищи, потерю аппетита, спазмы в животе и вздутие живота. Каждый из 8 симптомов оценивали по шкале от 0 до 10 (всего возможно 80 баллов). Этот опросник зафиксировал наиболее значимые симптомы EG/EGE. Ответ на лечение определяли как $>75\%$ снижение количества эозинофилов в биопсии ткани и $>30\%$ снижение шкалы общей оценки симптомов (TSS) по опроснику PRO на 13-14 неделе. Эти конечные точки были предназначены для демонстрации (1) истощения тканевых эозинофилов, (2) улучшения симптомов и (3) того, что эти эффекты наблюдались у одних и тех же людей.

Результаты

Это исследование было завершено и соответствовало всем заранее определенным первичным и вторичным конечным точкам.

Среднее исходное количество эозинофилов в желудочно-кишечном тракте у пациентов в группах лечения составляло 78, и среднее исходное количество эозинофилов в желудочно-кишечном тракте у пациентов в группе плацебо составляло 75. Среднее исходное значение TSS для пациентов в группах лечения составляло 34, и среднее исходное значение TSS для пациентов в группе плацебо составляло 30.

На **ФИГ. 1** показано, что первичная конечная точка была достигнута для всех групп, получавших анти-Siglec-8 антитело. Среднее снижение количества эозинофилов в

обеих группах лечения составило 95% по сравнению с исходным уровнем до 13-14 недель при p -значении $<0,0001$. Это включает снижение на 97%, наблюдаемое у пациентов из группы с высокой дозой, и снижение на 95%, наблюдаемое у пациентов из группы с низкой дозой. Напротив, в группе плацебо наблюдали среднее увеличение количества эозинофилов на 10%. Важно отметить, что у 37 из 39 пациентов (95%), получавших анти-Siglec-8 антитела, количество эозинофилов в желудке и двенадцатиперстной кишке было $<30/HPF$.

На **ФИГ. 2** показано, что вторичная конечная точка TSS также была достигнута для всех групп, получавших анти-Siglec-8 антитело. Среднее снижение TSS для обеих групп лечения составило 54% от исходного уровня до 13-14 недель при p -значении 0,0012. Это включает снижение на 58%, наблюдаемое у пациентов из группы с высокой дозой, и снижение на 49%, наблюдаемое у пациентов из группы с низкой дозой. Напротив, в группе плацебо наблюдали среднее снижение TSS только на 24%. Важно отметить, что статистически значимое улучшение симптомов наблюдали на 1 день после первой инфузии и оно сохранялось на протяжении всего исследования.

У пациентов, получавших анти-Siglec-8 антитело, наблюдали улучшения по всем симптомам. На **ФИГ. 3** показана доля снижения TSS от исходного уровня до конца лечения для каждого симптома в опроснике PRO у пациентов в группе с высокой дозой.

На **ФИГ. 4** показано, что вторичная конечная точка ответивших также была достигнута для всех групп, получавших анти-Siglec-8 антитело. Доля ответивших среди всех пациентов, получавших лечение анти-Siglec-8 антителом, составила 69% при p -значении 0,0008. Это включает 70% ответивших, наблюдаемых среди пациентов из группы с высокой дозой, и 68% ответивших, наблюдаемых среди пациентов из группы с низкой дозой. Напротив, только 5% в группе плацебо ответили на лечение.

Значительное снижение эозинофилов также наблюдалось у пациентов с EoE. Как показано на **ФИГ. 5**, 13 из 14 (93%) пациентов с EoE, получавших лечение анти-Siglec-8 антителом, показали <5 эозинофилов в HPF на 14-й неделе лечения по сравнению с 11% в группе плацебо. Кроме того, лечение анти-Siglec-8 также приводило к существенному уменьшению дисфагии (**ФИГ. 6**). Эти результаты демонстрируют как гистологические, так и симптоматические улучшения EoE при лечении анти-Siglec-8 антителами, что является убедительным подтверждением концепции использования лечения анти-Siglec-8 антителами по этому показанию.

Безопасность

По меньшей мере, 1 связанное с лечением нежелательное явление (АЕ), возникшее в результате лечения, наблюдалось у 91% пациентов, получавших лечение анти-Siglec-8 антителом, по сравнению с 82% в группе плацебо (**ФИГ. 7**). Лечение анти-Siglec-8 антителами обычно хорошо переносилось. IRR наблюдались у 61% пациентов, получавших анти-Siglec-8 антитело, по сравнению с 23% в группе плацебо. 95% IRR были от легкой до умеренной (*например*, приливы, чувство жара, головная боль, тошнота, головокружение). Одним серьезным АЕ, связанным с приемом лекарственного средства,

была IRR, но пациент выздоровел в течение 24 часов без каких-либо дальнейших последствий. Других значимых АЕ не наблюдали.

Пример 2: Фаза 2, многоцентровое открытое расширенное исследование для оценки безопасности и переносимости лечения анти-Siglec-8 антителами у пациентов с эозинофильным гастритом и/или эозинофильным гастроэнтеритом

Примерно 60 пациентов включены в это расширенное исследование, исходя из максимального числа пациентов, включенных в исследование фазы 2. Пациенты, завершившие исследование фазы 2, могут получить анти-Siglec-8 антитело открытым способом.

1 мг/кг анти-Siglec-8-антитела (не фукозилированное IgG1 антитело НЕКА) вводят для первой инфузии, после чего вводят дозу 3 мг/кг каждые 4 недели. Пациенты получают до 8 инфузий анти-Siglec-8 антитела каждые 28 (± 3) дней.

Перед первой инфузией АК002, 80 мг перорального преднизолона вводят за 12-24 часа до инфузии, и солумедрол (100 мг ВВ), цетиризин (10 мг перорально) и ацетаминофен (975-1000 мг перорально) вводят примерно за 1 час до инфузии.

В этом продолжающемся расширенном исследовании кортикостероид вводили за 12-24 часа до каждой первой дозы анти-Siglec-8 антитела (как описано выше). На сегодняшний день у 58 пациентов IRR не наблюдалось.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Все полипептидные последовательности представлены от N-конца к C-концу, 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

QVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAG
GSTNYNSALMSRLSISKDNSKSKVFLKINSLQTDALYYCARDGSSPYYYSM EYWGQ
GTSVTVSS (SEQ ID NO:1)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2
РНА

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT IYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSM EYW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:2)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2
РНВ

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLT IYGAHWVRQAPGKGLEWLGVIWA
GGSTNYNSALMSRLSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSM EYW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:3)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2
РНС

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMMEYW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:4)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHD

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWLSVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMMEYW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:5)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHE

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMMEYW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:6)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHF

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMMEYW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:7)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHG

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWA
GGSTNYNSALMSRFSISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMMEYW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:8)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHA2

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISYGAHWIRQPPGKGLEWIGVIWAGG
STNYNSALMSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGSSPYYYSMMEYWGQG
TLVTVSS (SEQ ID NO:9)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHB2

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAG
GSTNYNSALMSRFSISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDGSSPYYYSMMEYWGQ
GTLVTVSS (SEQ ID NO:10)

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYGMEYW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:11)

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи 2E2

RHE E-D

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAWVRQAPGKGLEWVGVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMDYW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:12)

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи 2E2 RHE Y-V

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAWVRQAPGKGLEWVGVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEVW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:13)

Аминокислотная последовательность тройного мутантного варибельного домена тяжелой цепи 2E2 RHE

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAWVRQAPGKGLEWVGVIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYGMDVW
GQGTTVTVSS (SEQ ID NO:14)

Аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи 2E2 МЫШИ

QIILTQSPAIMASAPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASG
VPVRFSGSGSGTSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:15)

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

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

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

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

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

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

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

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

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASG
IPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSSYPYTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:23)

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

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASG
IPARFSGSGSGTDYTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSSYPYTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:24)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи HEKA и тяжелой цепи HEKF

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIIWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYSMEYW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:75)

Аминокислотная последовательность легкой цепи HEKA

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASG
IPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:76)

Аминокислотная последовательность легкой цепи HEKF

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASG
IPARFSGSGSGTDYTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIKRTVAAPSVFIFPP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:77)

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:78)

Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG4

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHDHPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPEFL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:79)

Аминокислотная последовательность константной области каппа легкой цепи Ig

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:80)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 2C4 и 2E2 IgG1 мыши

QVQLKRASGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWA
GGSTNYNSALMSRLSISKDNSKQVFLKINSLQDDTALYYCARDGSSPYYYSMYEWG
QGTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGV
HTFPAVLESDLYTLSSSVTVPSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTV
PEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREE
QFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPK
EQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVNQ
KSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPG (SEQ ID NO:81)

Аминокислотная последовательность каппа легкой цепи 2C4 мыши

EIILTQSPAIMASAPGEEKVSITCSATSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASG
VPVRFSGSGSGTSSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKADAAPTVISIFP
PSSEQLTSGGASVVCFLNLFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSLSSST
LTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK (SEQ ID NO:82)

Аминокислотная последовательность каппа легкой цепи 2E2 мыши

QIILTQSPAIMASAPGEEKVSITCSATSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASG
VPVRFSGSGSGTSSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKADAAPTVISIFP
PSSEQLTSGGASVVCFLNLFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSLSSST
LTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK (SEQ ID NO:83)

Аминокислотная последовательность химерных тяжелых цепей 2C4 и 2E2 IgG1

QVQLKRASGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWA
GGSTNYNSALMSRLSISKDNSKQVFLKINSLQDDTALYYCARDGSSPYYYSMYEWG
QGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:84)

Аминокислотная последовательность химерной каппа легкой цепи 2C4

EIILTQSPAIMASAPGEEKVSITCSATSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASG
VPVRFSGSGSGTSSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:85)

Аминокислотная последовательность химерной каппа легкой цепи 2E2

QIILTQSPAIMASAPGEEKVSITCSATSSVSYMHWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASG
VPVRFSGSGSGTSSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS

TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:86)

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS^{LIYGAHWVRQAPGKGLEWVGV}IWA
GGSTNYNSALMSRFTISKDNSKNTVY^{LQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYSMEY}W
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSV^{TVPSSSLG}TKTYTCNV^{DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP}
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV^{VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT}
KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK^{TPPVLDSDGSFFLYS}
RLTVDKSRWQEGNVFSCSV^{MHEALHNHYTQKSLSL}SLG (SEQ ID NO:87)

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи 1C3 мыши (подчеркнутые остатки включают CDR H1 и H2 в соответствии с нумерацией Chothia)

EVQV^{VESGGDLVKSGGSLKLS}CAASG^{FPFSSY}AMSWVRQTPDKRLEWVAI^{SSG}
GSY^{TYYS}SDSVKGRFTISRDN^{AKNTLYLQ}MSS^{LK}SEDTAMYYCARHETAQA^{AWFAYWG}
QGTLVTVSA (SEQ ID NO:106)

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи 1H10 мыши (подчеркнутые остатки включают CDR H1 и H2 в соответствии с нумерацией Chothia)

EVQLQ^{QSGAELVRPGASVKLSCTASG}FN^{IKDY}MYWVKQRPEQGLEWIGRI^{APE}
DGDTEYAPK^{FQ}GKATVTADTSSNTAYLHLS^{SLT}SEDTAVYYCTTEGNYYGSSILDYWG
QGTTLTVSS (SEQ ID NO:107)

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи 4F11 мыши (подчеркнутые остатки включают CDR H1 и H2 в соответствии с нумерацией Chothia)

QVQLQ^{QSGAELVKPGASVKISCKASG}YAF^{RSS}WMNWVKQRPGKGLEWIGQI^{YP}
GDDY^{TNY}NGKFKGKVTLTADR^{SSSTAYMQLSSLT}SEDSAVYFCARLGPYGP^{FADWGQ}
GTLVTVSA (SEQ ID NO:108)

Аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи 1C3 мыши

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLA
YGVPARFSGSGSGTSYSLTIS^{SMEAEDAATYYC}QQWSSNPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID
NO:109)

Аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи 1H10 мыши

DIQMTQT^{TSSLSASL}GDRVTISCRASQDITNYLNWYQQKPDGTVKLLIYFTSRLHS
GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGG^{TKLEIK} (SEQ ID
NO:110)

Аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи 4F11

МЫШИ

QIVLTQSPAIVSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQRPGSSPRLLIYDTSSLASG
VPVRFSGSGSGTSLTISRIESEDAANYCQQWNSDPYTFGGGKLEIK (SEQ ID
NO:111)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ введения композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, индивидууму, нуждающемуся в этом, включающий:
введение кортикостероида индивидууму; и
по меньшей мере, через 6 часов после введения кортикостероида, введение индивидууму первой дозы композиции.
2. Способ введения композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, индивидууму, нуждающемуся в этом, включающий:
введение индивидууму первой дозы композиции;
где кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы.
3. Способ введения композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, индивидууму, нуждающемуся в этом, где способ включает введение индивидууму первой дозы композиции, где первую дозу композиции вводят индивидууму путем внутривенной инфузии в течение примерно 4 часов.
4. Способ по п. 3, дополнительно включающий введение кортикостероида индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы.
5. Способ по любому из пп. 1, 2 и 4, отличающийся тем, что кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 12 часов до введения первой дозы.
6. Способ по любому из пп. 1, 2, 4 и 5, отличающийся тем, что кортикостероид вводят индивидууму в течение 24 часов до введения первой дозы.
7. Способ по любому из пп. 1, 2 и 4-6, отличающийся тем, что кортикостероид представляет собой преднизон, кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон или преднизолон.
8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что 80 мг или более 0,5 мг/кг преднизолона вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы.
9. Способ по п. 7, отличающийся тем, что 80 мг преднизона вводят индивидууму, по меньшей мере, за 12 часов и менее чем за 24 часа до введения первой дозы.
10. Способ по любому из пп. 1, 2 и 4-9, отличающийся тем, что кортикостероид вводится индивидуумом самостоятельно.
11. Способ по любому из пп. 1, 2 и 4-10, отличающийся тем, что кортикостероид вводят индивидууму перорально.
12. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что первую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов.
13. Способ по любому из пп. 3-12, отличающийся тем, что менее 50% от общего объема первой дозы вводят индивидууму в первые 2 часа инфузии.
14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что менее 30% от общего объема первой дозы вводят индивидууму в первые 2 часа инфузии.
15. Способ по п. 13 или п. 14, отличающийся тем, что первую дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией по следующей схеме в хронологическом порядке: 1

мл/час в течение 15 минут, 5 мл/час в течение 15 минут, 10 мл/час в течение 30 минут, 15 мл/час в течение 30 минут, 25 мл/час в течение 30 минут, 30 мл/час в течение 30 минут, 35 мл/час в течение 30 минут и 40 мл/час в течение 62 минут.

16. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг в первой дозе.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от примерно 1 мг/кг до примерно 3 мг/кг в первой дозе.

18. Способ по п. 16, отличающийся тем, что антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве 1 мг/кг или 3 мг/кг в первой дозе.

19. Способ по любому из пп. 1, 2 и 4-18, отличающийся тем, что введение кортикостероида, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы снижает риск инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением первой дозы без введения кортикостероида, по меньшей мере, за 6 часов до.

20. Способ по любому из пп. 1, 2 и 4-18, отличающийся тем, что введение кортикостероида, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы снижает тяжесть инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением первой дозы без введения кортикостероида, по меньшей мере за 6 часов до.

21. Способ по любому из пп. 3-20, отличающийся тем, что введение первой дозы композиции внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов снижает риск инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением первой дозы внутривенной инфузией в течение периода, который составляет менее примерно 4 часов.

22. Способ по любому из пп. 3-21, отличающийся тем, что введение первой дозы композиции внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов снижает тяжесть инфузионной реакции (IRR) у индивидуума по сравнению с введением первой дозы внутривенной инфузией в течение периода, который составляет менее примерно 4 часов.

23. Способ по любому из пп. 1-22, дополнительно включающий введение кортикостероида индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы.

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что кортикостероид, вводимый индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы, представляет собой преднизон, кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон или преднизолон.

25. Способ по п. 23 или п. 24, отличающийся тем, что 80 мг или более 0,5 мг/кг преднизона вводят индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы.

26. Способ по п. 24, отличающийся тем, что кортикостероид, вводимый индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы, представляет собой метилпреднизолон.

27. Способ по п. 23 или п. 26, отличающийся тем, что 100 мг метилпреднизолона вводят индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы.

28. Способ по любому из пп. 1-27, дополнительно включающий введение антигистаминного препарата индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы.

29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что антигистаминный препарат представляет собой цетиризин.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что 10 мг цетиризина вводят индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы.

31. Способ по п. 29, отличающийся тем, что 10 мг цетиризина вводят индивидууму за 40 минут - 180 минут до введения первой дозы.

32. Способ по любому из пп. 28-31, отличающийся тем, что антигистаминный препарат вводят индивидууму перорально.

33. Способ по любому из пп. 1-32, дополнительно включающий введение пациенту жаропонижающего или нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (NSAID) за 1-2 часа до введения первой дозы.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что жаропонижающее средство представляет собой ацетаминофен.

35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что 975-1000 мг ацетаминофена вводят индивидууму за 1-2 часа до введения первой дозы.

36. Способ по п. 34, отличающийся тем, что 975-1000 мг ацетаминофена вводят индивидууму не менее чем за 40 минут и не более чем за 180 минут до введения первой дозы.

37. Способ по любому из пп. 33-36, отличающийся тем, что жаропонижающее или NSAID вводят индивидууму перорально.

38. Способ по любому из пп. 1-37, дополнительно включающий введение индивидууму второй дозы композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, где вторую дозу вводят индивидууму примерно через 28 дней или примерно через 4 недели после первой дозы.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что вторую дозу вводят индивидууму без введения кортикостероида индивидууму за 6-24 часа до введения второй дозы.

40. Способ по п. 38, отличающийся тем, что кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов до введения второй дозы.

41. Способ по любому из пп. 38-40, отличающийся тем, что вторую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов.

42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что менее 50% от общего объема второй дозы вводят индивидууму в первые 2 часа инфузии.

43. Способ по п. 42, отличающийся тем, что менее 30% от общего объема второй дозы вводят индивидууму в первые 2 часа инфузии.

44. Способ по п. 42 или п. 43, отличающийся тем, что вторую дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 1 мл/час в течение 15 минут, 5 мл/час в течение 15 минут, 10 мл/час в течение 30 минут, 15 мл/час в течение 30 минут, 25 мл/час в течение 30 минут, 30 мл/час в течение 30 минут, 35 мл/час в течение 30 минут и 40 мл/час в течение 62 минут.

45. Способ по любому из пп. 38-44, отличающийся тем, что антитело, которое

связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг во второй дозе.

46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве от примерно 1 мг/кг до примерно 3 мг/кг во второй дозе.

47. Способ по п. 45, отличающийся тем, что антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве 1 мг/кг или 3 мг/кг во второй дозе.

48. Способ по п. 46 или п. 47, отличающийся тем, что антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, вводят индивидууму в количестве 1 мг/кг в первой дозе и 3 мг/кг во второй дозе.

49. Способ по любому из пп. 38-48, дополнительно включающий введение кортикостероида индивидууму за 1-2 часа до введения второй дозы.

50. Способ по п. 49, отличающийся тем, что кортикостероид, вводимый индивидууму за 1-2 часа до введения второй дозы, представляет собой преднизон, кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон или преднизолон.

51. Способ по п. 49 или п. 50, отличающийся тем, что 100 мг метилпреднизолона вводят индивидууму за 1-2 часа до введения второй дозы.

52. Способ по любому из пп. 38-51, дополнительно включающий введение антигистаминного препарата индивидууму за 1-2 часа до введения второй дозы.

53. Способ по п. 52, отличающийся тем, что антигистаминный препарат представляет собой цетиризин.

54. Способ по п. 53, отличающийся тем, что 10 мг цетиризина вводят индивидууму за 1-2 часа до введения второй дозы.

55. Способ по любому из пп. 52-54, отличающийся тем, что антигистаминное средство вводят индивидууму перорально.

56. Способ по любому из пп. 38-55, дополнительно включающий введение пациенту жаропонижающего или нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (NSAID) за 1-2 часа до введения второй дозы.

57. Способ по п. 56, отличающийся тем, что жаропонижающее средство представляет собой ацетаминофен.

58. Способ по п. 57, отличающийся тем, что 975-1000 мг ацетаминофена вводят индивидууму за 1-2 часа до введения второй дозы.

59. Способ по любому из пп. 56-58, отличающийся тем, что жаропонижающее или NSAID вводят индивидууму перорально.

60. Способ по любому из пп. 38-59, дополнительно включающий введение индивидууму третьей дозы композиции, содержащей антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, где третью дозу вводят индивидууму примерно через 28 дней или примерно через 4 недели после второй дозы.

61. Способ по п. 60, отличающийся тем, что третью дозу вводят индивидууму без введения кортикостероида индивидууму за 6-24 часа до введения третьей дозы.

62. Способ по п. 60, отличающийся тем, что кортикостероид вводят индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов до введения третьей дозы.

63. Способ по любому из пп. 60-62, отличающийся тем, что третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 2 часов до примерно 4 часов.

64. Способ по п. 63, отличающийся тем, что третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 2 часов.

65. Способ по п. 64, отличающийся тем, что третью дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 10 мл/час в течение 30 минут, 25 мл/час в течение 15 минут, 40 мл/час в течение 15 минут, 55 мл/час в течение 15 минут, 70 мл/час в течение 15 минут, 85 мл/час в течение 15 минут и 100 мл/час в течение 16 минут.

66. Способ по п. 63, отличающийся тем, что третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 3 часов.

67. Способ по п. 66, отличающийся тем, что третью дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 2 мл/час в течение 30 минут, 10 мл/час в течение 30 минут, 20 мл/час в течение 30 минут, 40 мл/час в течение 30 минут и 60 мл/час в течение 64 минут.

68. Способ по п. 63, отличающийся тем, что третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов.

69. Способ по п. 68, отличающийся тем, что третью дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 1 мл/час в течение 15 минут, 5 мл/час в течение 15 минут, 10 мл/час в течение 30 минут, 15 мл/час в течение 30 минут, 25 мл/час в течение 30 минут, 30 мл/час в течение 30 минут, 35 мл/час в течение 30 минут и 40 мл/час в течение 62 минут.

70. Способ по любому из пп. 60-62, отличающийся тем, что третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 1 часа.

71. Способ по п. 70, отличающийся тем, что третью дозу вводят индивидууму внутривенной инфузией в соответствии со следующей схемой в хронологическом порядке: 24 мл/час в течение 15 минут и 125,3 мл/час в течение 45 минут.

72. Способ по любому из пп. 1-60, отличающийся тем, что указанный способ включает:

введение индивидууму первой дозы композиции в 1 день, где первую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов;

введение индивидууму второй дозы композиции на 29 день, где вторую дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение примерно 4 часов; и

введение индивидууму третьей дозы композиции на 57 день, где третью дозу композиции вводят индивидууму внутривенной инфузией в течение периода от примерно 1 до примерно 4 часов.

73. Способ по п. 72, дополнительно включающий введение кортикостероида

индивидууму, по меньшей мере, за 6 часов до введения первой дозы.

74. Способ по любому из пп. 1-73, отличающийся тем, что у субъекта имеется или было диагностировано заболевание или нарушение, характеризующееся одним или несколькими из следующих факторов: повышения активности эозинофилов, повышения активности тучных клеток, экспрессирующих Siglec-8, повышения эозинофилов и/или тучных клеток или повышенной активации эозинофилов и/или тучных клеток.

75. Способ по любому из пп. 1-73, отличающийся тем, что у индивидуума имеется или было диагностировано заболевание или нарушение, выбранное из группы, состоящей из: хронического риносинусита с сопутствующей астмой, аспирин-индуцированного респираторного заболевания, приобретенной не-атопической астмы с заболеванием носовых пазух, хронической обструктивной болезни легких, фиброзного заболевания, предфиброзного заболевания, распространенного системного мастоцитоза, вялотекущего системного мастоцитоза (ISM), воспалительного заболевания кишечника (IBD), эозинофильного эзофагита (EOE), эозинофильного гастрита (EG), эозинофильного гастроэнтерита (EGE), эозинофильного дуоденита, эозинофильного колита (EOC), тучноклеточного гастрита или тучноклеточного гастроэнтерита, гастрита или гастроэнтерита с повышенными тучными клетками, синдрома раздраженного кишечника с повышенными тучными клетками, функционального заболевания желудочно-кишечного тракта, аллергического конъюнктивита, гигантского папиллярного конъюнктивита, хронической крапивницы, аллергического бронхолегочного аспергиллеза (ABPA), аллергической астмы, астмы с эозинофильным или тучноклеточным фенотипом, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом (EGPA), глютеновой болезни, гастропареза, гиперэозинофильного синдрома, атопического дерматита, анафилаксии, ангионевротического отека, синдрома/нарушения активации тучных клеток и эозинофильного фасциита.

76. Способ по любому из пп. 1-73, отличающийся тем, что указанный способ применяют для лечения индивидуума, у которого имеется или было диагностировано заболевание или нарушение, выбранное из группы, состоящей из: хронического риносинусита с сопутствующей астмой, аспирин-индуцированного респираторного заболевания, приобретенной не-атопической астмы с заболеванием носовых пазух, хронической обструктивной болезни легких, фиброзного заболевания, предфиброзного заболевания, распространенного системного мастоцитоза, вялотекущего системного мастоцитоза (ISM), воспалительного заболевания кишечника (IBD), эозинофильного эзофагита (EOE), эозинофильного гастрита (EG), эозинофильного гастроэнтерита (EGE), эозинофильного дуоденита, эозинофильного колита (EOC), тучноклеточного гастрита или тучноклеточного гастроэнтерита, гастрита или гастроэнтерита с повышенными тучными клетками, синдрома раздраженного кишечника с повышенными тучными клетками, функционального заболевания желудочно-кишечного тракта, аллергического конъюнктивита, гигантского папиллярного конъюнктивита, хронической крапивницы, аллергического бронхолегочного аспергиллеза (ABPA), аллергической астмы, астмы с

эозинофильным или тучноклеточным фенотипом, эозинофильного гранулематоза с полиангиитом (EGPA), глютеновой болезни, гастропареза, гиперэозинофильного синдрома, атопического дерматита, анафилаксии, ангионевротического отека, синдрома/нарушения активации тучных клеток и эозинофильного фасциита.

77. Способ по любому из пп. 1-76, отличающийся тем, что антитело содержит Fc область и N-гликозид-связанные углеводные цепи, связанные с Fc областью, где менее 50% N-гликозид-связанных углеводных цепей антитела в композиции содержат фукозный остаток.

78. Способ по п. 77, отличающийся тем, что по существу ни одна из N-гликозид-связанных углеводных цепей антитела в композиции не содержит фукозного остатка.

79. Способ по любому из пп. 1-78, отличающийся тем, что указанное 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 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.

80. Способ по любому из пп. 1-78, отличающийся тем, что указанное 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.

81. Способ по любому из пп. 1-78, отличающийся тем, что указанное 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.

82. Способ по любому из пп. 1-78, отличающийся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:76.

83. Способ по любому из пп. 1-78, отличающийся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:87; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:77.

84. Способ по любому из пп. 1-78, отличающийся тем, что указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:11-14; и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:23-24.

85. Способ по любому из пп. 1-78, отличающийся тем, что указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:2-14; и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:16-24.

86. Способ по любому из пп. 1-78, отличающийся тем, что указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:2-10; и/или переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:16-22.

87. Способ по любому из пп. 1-78, отличающийся тем, что указанное антитело содержит:

(а) переменную 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

(б) переменную 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, содержащую 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.

88. Способ по любому из пп. 1-78, отличающийся тем, что указанное антитело содержит:

(а) 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

(б) 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.

89. Способ по любому из пп. 1-78, отличающийся тем, что указанное антитело содержит:

(а) 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

(б) 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.

90. Способ по любому из пп. 1-78, отличающийся тем, что указанное 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.

91. Способ по любому из пп. 1-78, отличающийся тем, что указанное 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 вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:110; или

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

92. Способ по любому из пп. 79-91, отличающийся тем, что антитело представляет собой антитело человека, гуманизированное антитело или химерное антитело.

93. Способ по любому из пп. 79-92, отличающийся тем, что указанное антитело истощает эозинофилы крови и ингибирует активацию тучных клеток.

94. Способ по любому из пп. 79-93, отличающийся тем, что указанное антитело содержит Fc область тяжелой цепи, содержащую Fc область IgG человека.

95. Способ по п. 94, отличающийся тем, что Fc область IgG человека содержит Fc область IgG1 человека.

96. Способ по п. 95, отличающийся тем, что Fc область IgG1 человека является не фукозилированной.

97. Способ по п. 94, отличающийся тем, что Fc область IgG человека содержит Fc область IgG4 человека.

98. Способ по п. 97, отличающийся тем, что Fc область IgG4 человека содержит аминокислотную замену S228P, где аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, как в Kabat.

99. Способ по любому из пп. 79-93, отличающийся тем, что антитело было сконструировано для улучшения активности антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).

100. Способ по п. 99, отличающийся тем, что указанное антитело содержит, по меньшей мере, одну аминокислотную замену в Fc области, которая улучшает активность ADCC.

101. Способ по любому из пп. 79-93, отличающийся тем, что по меньшей мере, одна или две тяжелые цепи антитела не фукозилированы.

102. Способ по любому из пп. 1-101, отличающийся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело.

103. Способ по любому из пп. 1-102, отличающийся тем, что индивидуумом является человек.

104. Способ по любому из пп. 1-103, отличающийся тем, что композиция содержит антитело и фармацевтически приемлемый носитель.

105. Набор, содержащий лекарственное средство, содержащее композицию, содержащую антитело, которое связывается с Siglec-8 человека, и листок-вкладыш, содержащий инструкции по введению лекарственного средства индивидууму, нуждающемуся в этом, по любому из пп. 1-104.

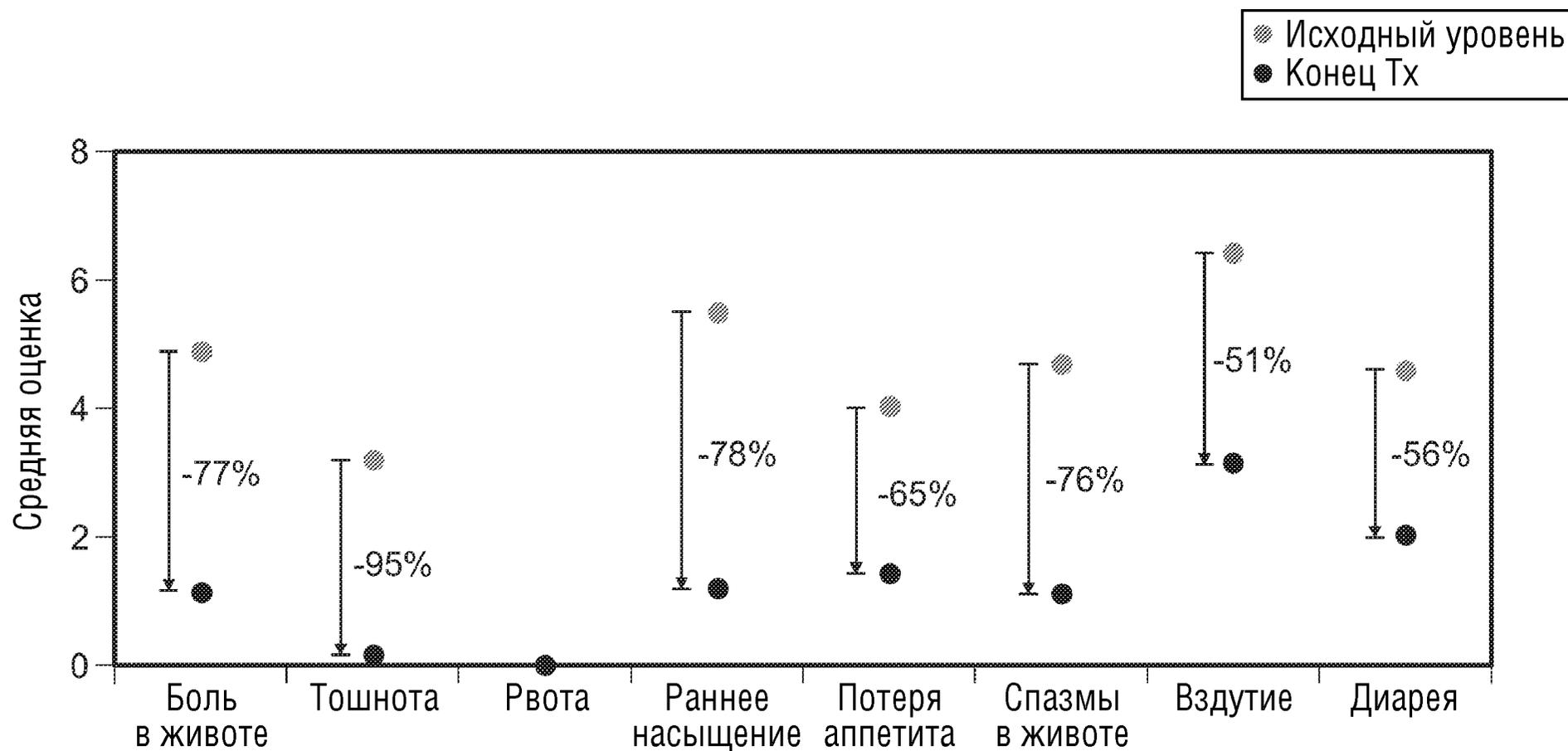
ФИГ.1

Группа лечения	Исходное количество эозинофилов/HPF	Средний % Δ количества эозинофилов	р-значение
Высокая доза анти-Siglec-8 (n=20)	76	-97%	<0.0001
Низкая доза анти-Siglec-8 (n=19)	80	-92%	<0.0001
Комбинированное анти-Siglec-8 (n=39)	78	-95%	<0.0001
Плацебо (n=20)	75	+10%	-

ФИГ.2

Группа лечения	Исходная TSS	Средний % изменения TSS	р-значение
Высокая доза анти-Siglec-8 (n=20)	34	-58%	0.0012
Низкая доза анти-Siglec-8 (n=19)	35	-49%	0.0150
Комбинированное анти-Siglec-8 (n=39)	34	-54%	0.0012
Плацебо (n=20)	30	-24%	-

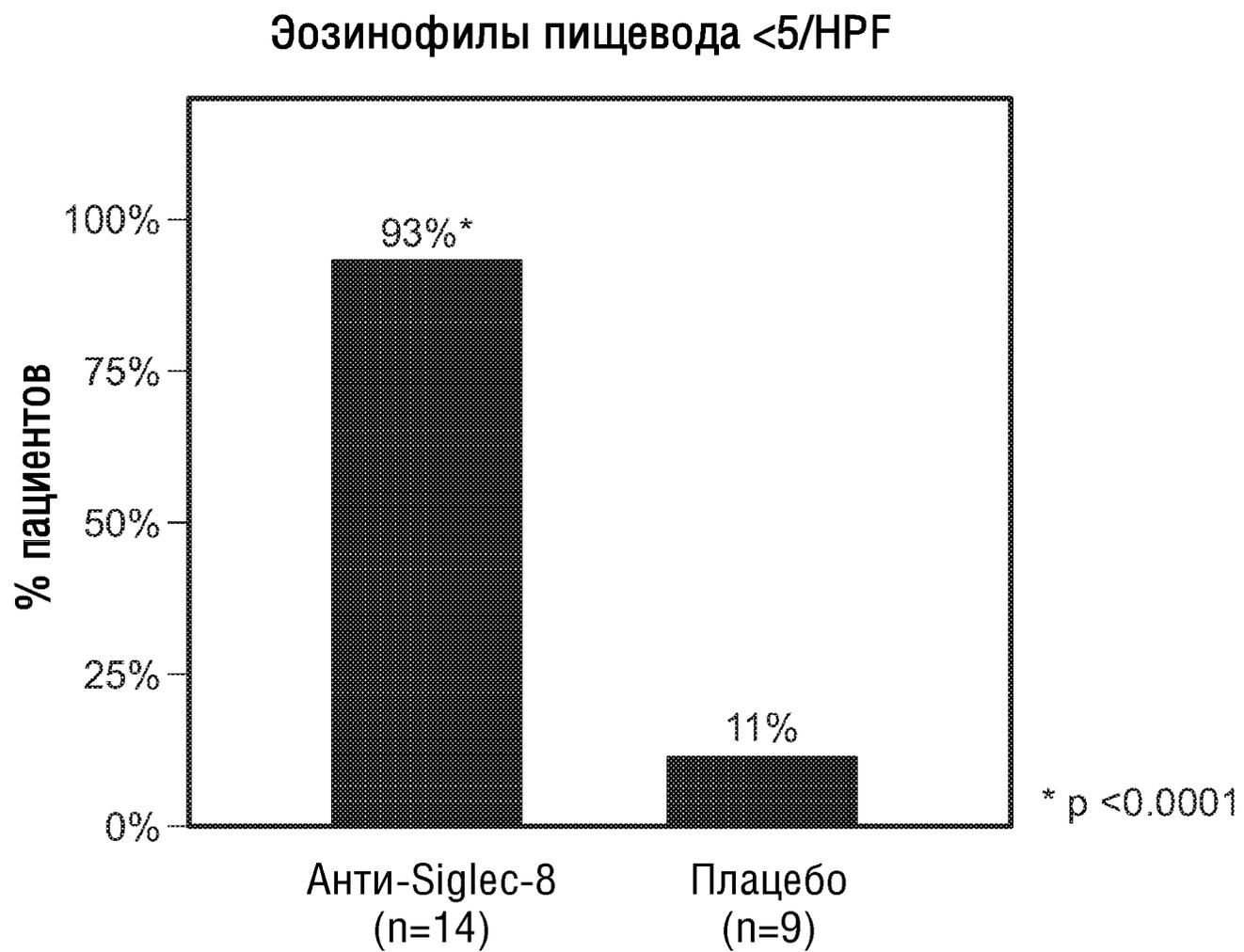
ФИГ.3



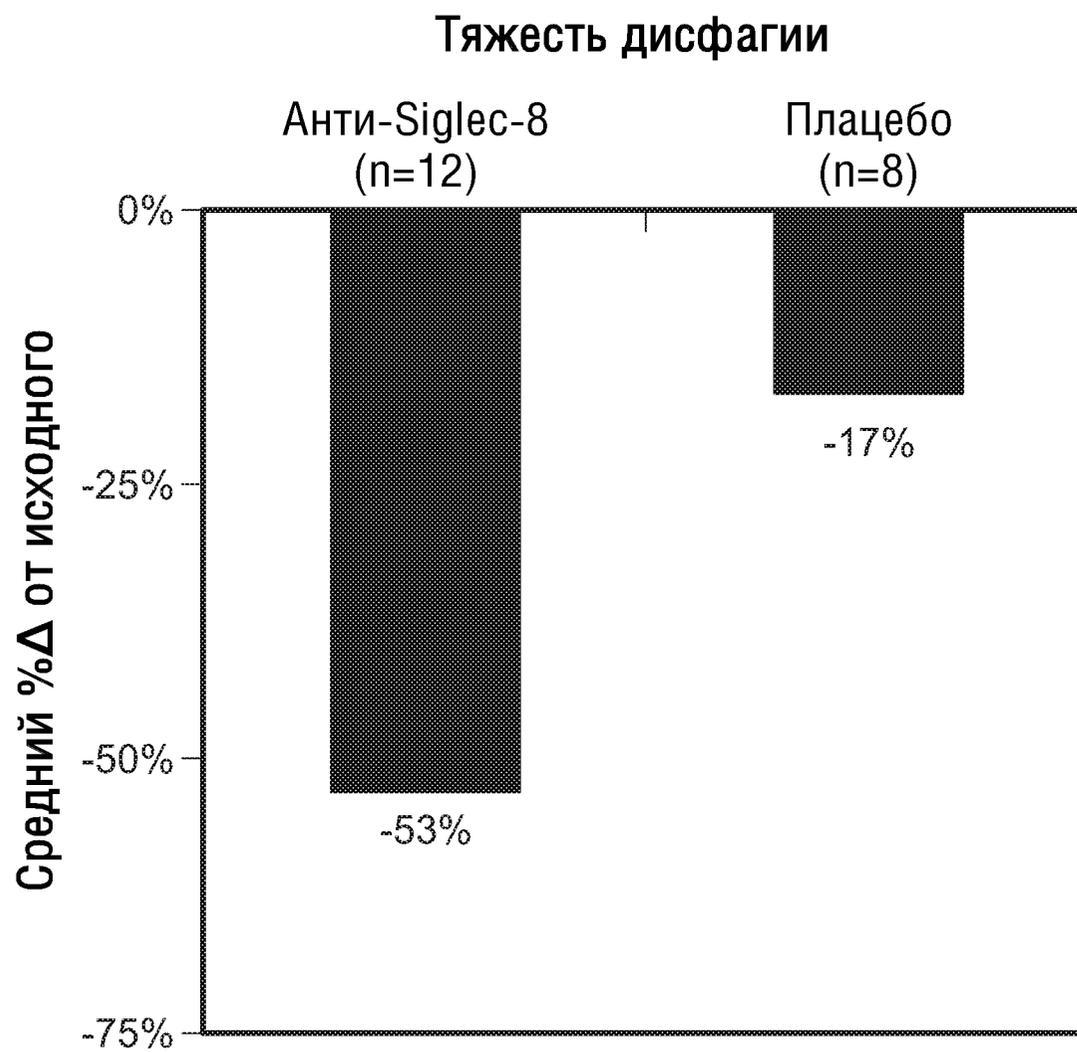
ФИГ.4

Группа лечения	Ответившие на лечение	р-значение
Высокая доза анти-Siglec-8 (n=20)	70%	0.0009
Низкая доза анти-Siglec-8 (n=19)	68%	0.0019
Комбинированное анти-Siglec-8 (n=39)	69%	0.0008
Плацебо (n=20)	5%	-

ФИГ.5



ФИГ.6



ФИГ.7

% пациентов (n)	Анти-Siglec-8 (n=43)	Плацебо (n=22)
≥1 нежелательных явлений, вызванных лечением (TEAE)	91% (39)	82% (18)
Инфузионная реакция	61% (26)	23% (5)
Головная боль	9% (4)	9% (2)
Инфекция верхних дыхательных путей	9% (4)	9% (2)
Инфекция мочевыводящих путей	9% (4)	5% (1)
Тошнота	7% (3)	14% (3)
Утомляемость	7% (3)	9% (2)
Диарея	5% (2)	9% (2)
Назофарингит	5% (2)	9% (2)
Боль в животе	2% (1)	9% (2)
Обезвоживание	2% (1)	9% (2)
Вирусный гастроэнтерит	2% (1)	9% (2)
Гипертермия	2% (1)	9% (2)
Синусит	2% (1)	9% (2)