

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292766 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.06

(51) Int. Cl. A61P 25/28 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.04.23

(54) ИНТЕРЛЕЙКИН-34-НАЦЕЛЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ИХ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

(31) 63/017,748

(32) 2020.04.30

(33) US

(86) PCT/US2021/028861

(87) WO 2021/222025 2021.11.04

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

Чедид Марсио, Обунгу Виктор Х.,
Скора Эндрю Диксон, Е Мин (US)

(74) Представитель:

Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М.,
Угрюмов В.М., Костюшенкова М.Ю.,
Строкова О.В., Джермакян Р.В.,
Христофоров А.А. (RU)

(57) Изобретение относится к антителам против IL-34, содержащим их композиции и способам применения антител и/или их композиций для лечения иммуноопосредованных заболеваний, таких как нейродегенеративные заболевания, например болезнь Альцгеймера или таупатия.

202292766

A1

A1

202292766

ИНТЕРЛЕЙКИН-34-НАЦЕЛЕННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И СПОСОБЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Данное изобретение относится к соединениям, фармацевтическим композициям и способам, которые включают антитела, нацеленные против интерлейкина-34 (IL-34) человека, которые, как ожидается, будут применимы в области нейровоспаления и острых или хронических воспалительных заболеваний. В частности, ожидается, что варианты реализации данного изобретения будут полезны при лечении и/или диагностики болезни Альцгеймера, а также других таупатий.

Болезнь Альцгеймера (БА), ведущая причина деменции, развивается у одного процента населения в возрасте от 65 до 69 лет и увеличивается до 40-50% в возрасте 95 лет и старше. У пациентов с БА проявляются отчетливые клинические симптомы, которые включают когнитивные нарушения и дефицит функции памяти. У этих пациентов наличие БА подтверждается плотными сенильными бляшками и нейрофибриллярными клубками (NFT), обнаруженными в коре головного мозга при посмертном гистопатологическом исследовании. Зрелые сенильные бляшки состоят из внеклеточных β -амилоидных пептидов, образовавшихся в результате ферментативного процессинга белка-предшественника амилоида, и внутриклеточных нейрофибриллярных клубков (NFT), образовавшихся из филаментов гиперфосфорилированных тау-белков. Агрегаты гиперфосфорилированного тау, такие как нейрофибриллярные клубки, связаны со степенью когнитивных нарушений при болезни Альцгеймера. При БА и различных других таупатиях скопления тау появляются в определенных областях мозга и паттернах, которые связаны с риском, началом и/или прогрессированием заболевания, и эти области и паттерны известны специалистам в данной области техники.

Цитокины регулируют нормальные гомеостатические функции тканей, и нарушение регуляции этих цитокиновых сетей связано с патологическими состояниями. Центральная нервная система (ЦНС), в которой циркулирует небольшое количество иммунных клеток крови, по-видимому, особенно уязвима для нарушения регуляции цитокиновых сетей. При нейродегенеративных заболеваниях резидентные клетки ЦНС являются преобладающими продуцентами провоспалительных цитокинов и могут способствовать нарушению регуляции цитокиновых сетей и нейровоспалению. Повреждение ЦНС может включать рекрутирование циркулирующих иммунных клеток, что приводит к врожденному иммунному ответу, состоящему из резидентной микроглии, моноцитов периферического происхождения, макрофагов и дендритных клеток. Состояния активации микроглии и макрофагов не являются строго про- или противовоспалительными, а вместо этого могут

иметь спектр функциональных состояний. Микроглия и/или моноциты и макрофаги периферического происхождения могут приобретать противовоспалительный фенотип, при котором они удаляют дебрис и способствуют регенерации и гомеостазу. Дисфункция или повреждение нейронов также могут активировать микроглию для продуцирования провоспалительных цитокинов и рекрутирования лейкоцитов из кровотока. При нейродегенеративных состояниях, таких как болезнь Альцгеймера (БА), активация микроглии является частой находкой и отражает реакцию ткани на накопление внеклеточных бета-амилоидных бляшек и гиперфосфорилированных агрегатов тау. Нейровоспаление является важным компонентом нейродегенеративных заболеваний и характеризуется повышенной продукцией провоспалительных цитокинов клетками ЦНС (Becher, B., Spath, S. & Goverman, J. *Cytokine networks in neuroinflammation*. Nat Rev Immunol 17, 49–59 (2017)). Считается, что нейровоспаление и микроглиоз являются механизмами, лежащими в основе нейродегенеративных заболеваний, таких как накопление бляшек при болезни Альцгеймера, гибель и дисфункция нейронов при болезни Паркинсона и болезни Гентингтона.

Микроглиоз включает аномальную пролиферацию и/или гипертрофию микроглии в ответ на воспалительные сигналы. В широком смысле IL-34 действует как сильнодействующий и плеiotропный цитокин в регуляции воспалительных и иммунных процессов и является ключевым регуляторным цитокином для роста резидентной микроглии в ЦНС при нормальном тканевом гомеостазе. IL-34 экспрессируется нейронами коры, переднего обонятельного ядра и гиппокампа. IL-34 тесно связан с колониестимулирующим фактором 1 (CSF1; также известным как M-CSF), и оба цитокина связываются с рецептором CSF1. IL-34 представляет собой секретируемый гомодимерный цитокин, который действует как один из двух активирующих лигандов для CSF1R и запускает аутофосфорилирование и димеризацию рецептора с последующей активацией множественных сигнальных путей (см., например, *Structural basis for the dual recognition of helical cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R*. Structure 20, 676–687, and Felix J, De Munck S, Verstraete K, Meuris L, Callewaert N, Elegheert J. et al.). Полипептиды IL-34 человека и мыши раскрыты, например, в патенте США № 9,770,486. IL-34 представляет собой белок из 242 аминокислот у человека (SEQ ID NO: 41) и 235 аминокислот у мыши (SEQ ID NO: 42).

Антитела против IL-34 были описаны в данной области техники, и, например, в WO 2016/196679 перечислены различные антитела против IL-34 и их потенциальное применение. Однако, на текущий момент ни одно антитело, нацеленное на IL-34, не было одобрено для терапевтического применения.

Таким образом, сохраняется неудовлетворенная потребность в альтернативных и/или улучшенных антителах против IL-34, их фармацевтических композициях и способах их применения в терапевтических и/или диагностических целях, связанных с иммуноопосредованными заболеваниями, включающими IL-34, и/или заболеваниями, излечимыми с помощью антитела против IL-34, такими как нейровоспалительные расстройства, и/или болезнь Альцгеймера. Кроме того, сохраняется неудовлетворенная потребность в альтернативных и/или улучшенных антителах против IL-34, которые обладают сочетанием особенно преимущественных свойств по сравнению с антителами против IL-34 предшествующего уровня техники с точки зрения по меньшей мере одного или более из следующих свойств: 1) желаемые скорости ассоциации и диссоциации, 2) способность нейтрализовать IL-34 человека для достижения антинеуровоспалительного ответа и эффективности *in vivo*, 3) достаточная эффективность в качестве монотерапии для лечения и/или предотвращения иммуноопосредованных и/или воспалительных заболеваний; 4) устойчивая продолжительность действия; 5) достаточно ограниченная индукция нежелательного высвобождения цитокинов, 6) приемлемо низкая иммуногенность (т.е. достаточно неиммуногенные для человека); 7) предотвращение неблагоприятного иммунодефицита; и/или 8) желаемая стабильность *in vivo*, физическая и химическая стабильность, включая, но не ограничиваясь, термическую стабильность, растворимость, низкую самоассоциацию и фармакокинетические характеристики, которые приемлемы для разработки и/или лечения воспалительных или нейровоспалительных расстройств, например БА.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В вариантах реализации данного изобретения предложены новые антитела против IL-34 человека и антитела против IL-34 мыши. Согласно некоторым вариантам реализации данного изобретения в данном изобретении предложены антитела, которые содержат переменную область легкой цепи (LCVR) и переменную область тяжелой цепи (HCVR), при этом LCVR содержит области, определяющие комплементарность (CDR) - LC1DR1, LC1DR2 и LC1DR3, и HCVR содержит CDR - HC1DR1, HC1DR2 и HC1DR3, выбранные из групп комбинаций CDR, представленных в Таблице 1. Идентификаторы последовательностей, используемые в данном документе, перечислены в Таблице 1, а последовательности представлены в приведенном в данном документе списке аминокислотных и нуклеотидных последовательностей.

Таблица 1: Аминокислотные и Нуклеотидные Последовательности

	Антитело 1	Антитело 2	Антитело 3
SEQ ID HC	1	13	19
SEQ ID LC	2	2	20
SEQ ID HCVR	3	14	21
SEQ ID LCVR	4	4	22
SEQ ID HCDR1	5	15	23
SEQ ID HCDR2	6	16	24
SEQ ID HCDR3	7	17	25
SEQ ID LCDR1	8	8	26
SEQ ID LCDR2	9	9	27
SEQ ID LCDR3	10	10	28
SEQ ID: ДНК HC	11	18	29
SEQ ID: ДНК LC	12	12	30

Соответственно, в вариантах реализации данного изобретения также предложены антитела, содержащие LCVR и HCVR, выбранные из:

- a. LCVR, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и HCVR, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;
- b. LCVR, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и HCVR, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;
- c. LCVR, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и HCVR, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

Согласно другим вариантам реализации данного изобретения в данном изобретении также предложены антитела, содержащие комбинацию LCVR и HCVR, как описано выше в пунктах а-с, с шарнирной областью и Fc-областью, выбранными из последовательностей SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52.

Согласно другим вариантам реализации данного изобретения в данном изобретении также предложены антитела, содержащие LC и HC, выбранные из или имеющие по меньшей мере 95% гомологии относительно аминокислотным последовательностям:

- a. LC, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HC, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;
- b. LC, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и HC, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и

с. LC, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и HC, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

Используемый в контексте данного документа термин «Антитело 1» относится к антителу, имеющему аминокислотную последовательность HCDR1 - SEQ ID NO: 5, аминокислотную последовательность HCDR2 - SEQ ID NO: 6, аминокислотную последовательность HCDR3 - SEQ ID NO: 7, аминокислотную последовательность LCDR1 - SEQ ID NO: 8, аминокислотную последовательность LCDR2 - SEQ ID NO: 9, аминокислотную последовательность LCDR3 - SEQ ID NO: 10, аминокислотную последовательность HCVR - SEQ ID NO: 3, аминокислотную последовательность LCVR - SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность HC - SEQ ID NO: 1, аминокислотную последовательность LC - SEQ ID NO: 2, последовательность ДНК HC - SEQ ID NO: 11 и последовательность ДНК LC - SEQ ID NO: 12. Последовательности каркасной области и CDR в каждом из антител, для которых изложены последовательности, аннотированы с использованием правил аннотации в соответствии со способом North, *et al.* *J. Mol. Biol.* 2011: 406: 228-256, если в тексте не указано иное.

Используемый в контексте данного документа термин «Антитело 2» относится к антителу, имеющему аминокислотную последовательность HCDR1 - SEQ ID NO: 15, аминокислотную последовательность HCDR2 - SEQ ID NO: 16, аминокислотную последовательность HCDR3 - SEQ ID NO: 17, аминокислотную последовательность LCDR1 - SEQ ID NO: 8, аминокислотную последовательность LCDR2 - SEQ ID NO: 9, аминокислотную последовательность LCDR3 - SEQ ID NO: 10, аминокислотную последовательность HCVR - SEQ ID NO: 14, аминокислотную последовательность LCVR - SEQ ID NO: 4, аминокислотную последовательность HC - SEQ ID NO: 13, аминокислотную последовательность LC - SEQ ID NO: 2, последовательность ДНК HC - SEQ ID NO: 18 и последовательность ДНК LC - SEQ ID NO: 12. Последовательности каркасной области и CDR в каждом из антител, для которых изложены последовательности, аннотированы с использованием правил аннотации в соответствии со способом North, *et al.* *J. Mol. Biol.* 2011: 406: 228-256, если в тексте не указано иное.

Используемый в контексте данного документа термин «Антитело 3» относится к антителу, имеющему аминокислотную последовательность HCDR1 - SEQ ID NO: 23, аминокислотную последовательность HCDR2 - SEQ ID NO: 24, аминокислотную последовательность HCDR3 - SEQ ID NO: 25, аминокислотную последовательность LCDR1 - SEQ ID NO: 26, аминокислотную последовательность LCDR2 - SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность LCDR3 - SEQ ID NO: 28, аминокислотную последовательность HCVR - SEQ ID NO: 21, аминокислотную последовательность LCVR -

SEQ ID NO: 22, аминокислотную последовательность HC - SEQ ID NO: 19, аминокислотную последовательность LC - SEQ ID NO: 20, последовательность ДНК HC - SEQ ID NO: 29 и последовательность ДНК LC - SEQ ID NO: 30. Последовательности каркасной области и CDR в каждом из антител, для которых изложены последовательности, аннотированы с использованием правил аннотации в соответствии со способом North, *et al.*. *J. Mol. Biol.* 2011: 406: 228-256, если в тексте не указано иное.

Карбоксиконцевая часть каждой HC определяет константную область, в первую очередь отвечающую за эффекторные функции, и в некоторых вариантах реализации данного изобретения антитела имеют одну или более модификаций в константной области каждой HC, которые снижают эффекторные функции. Предпочтительно варианты реализации данного изобретения представляют собой антитела IgG4 и, таким образом, содержат Fc-область IgG4 или Fc-область, полученную из IgG4 человека, например, модифицированную Fc-область IgG4.

Согласно некоторым вариантам реализации данного изобретения в шарнирную область IgG4 и Fc-область вносят модификации константной области обеих HC, которые снижают эффекторные функции, и аминокислотные замены. Таким образом, некоторые варианты реализации данного изобретения имеют модификации в константной области обеих HC, которые включают аминокислоту аланин в обоих остатках 230 и 231 (примерами являются HC антитела 1, HC антитела 2 и SEQ ID NO: 52 соответственно), и дополнительные модификации в константной области обеих HC, способствующие стабильности, включая аминокислоту пролин в остатке 224 (примерами являются HC антитела 1, HC антитела 2 и, например, SEQ ID NO: 51), и делецию аминокислоты лизин в остатке 443 (примером является HC SEQ ID NO.1).

Считается, что антитела по данному изобретению обладают сочетанием особенно преимущественных свойств по сравнению с антителами против IL-34 предшествующего уровня техники, включая, но не ограничиваясь, одно или более из следующих свойств: 1) желаемые скорости ассоциации и диссоциации, 2) способность нейтрализовать IL-34 человека для достижения антинейровоспалительного ответа и эффективности *in vivo*, 3) достаточная эффективность в качестве монотерапии для лечения и/или предотвращения иммуноопосредованных и/или воспалительных заболеваний; 4) устойчивая продолжительность действия; 5) достаточно ограниченная индукция нежелательного высвобождения цитокинов, 6) приемлемо низкая иммуногенность (т.е. достаточно неиммуногенные для человека); 7) предотвращение неблагоприятного иммунодефицита; и/или 8) желаемая стабильность *in vivo*, физическая и химическая стабильность, включая, но не ограничиваясь, термическую стабильность, растворимость, низкую самоассоциацию

и фармакокинетические характеристики, которые приемлемы для разработки и/или лечения воспалительных или нейровоспалительных расстройств, например БА.

В вариантах реализации данного изобретения предложен значимый прогресс по сравнению с предшествующим уровнем техники за счет предоставления композиций и способов, пригодных для предотвращения, подавления или ослабления расстройств, связанных с воспалением и/или нейровоспалением, посредством нейтрализации IL-34 с помощью использования фармакологически улучшенного антитела против IL-34, как предложено в вариантах реализации данного изобретения, описанных в данном документе. Антитела против IL-34 человека по данному изобретению способны ослаблять иммунную и/или воспалительную патологию или восстанавливать иммунный гомеостаз, предпочтительно, посредством ингибирования врожденного звена иммунного ответа и/или подавления микроглиоза или другой моноцитарной/макрофагальной клеточной активации и/или пролиферации, тем самым непосредственно модифицируя патологию, лежащую в основе заболевания. Применение таких антител в клинической практике может привести к стойкому и долгосрочному улучшению течения заболевания (заболеваний), которое лечат.

Кроме того, существует потребность в диагностических антителах против IL-34 человека, которые являются специфичными в отношении IL-34 человека, обладают улучшенной аффинностью связывания и демонстрируют повышенную чувствительность при определении IL-34 человека, а также существует потребность в улучшенных условиях анализа с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), которые приводят к минимальной интерференции и широкой линейности разведения. Согласно некоторыми аспектами данного изобретения предложены антитела против IL-34 человека, включая нейтрализующие антитела против IL-34 человека, которые связывают IL-34 человека, указанный в последовательности SEQ ID NO: 41. Интерлейкин 34 (IL-34; также известный как неохарактеризованный белок C16orf77) секретируется в виде гомодимера, состоящего из мономеров с молекулярной массой 39 кДа. Он принадлежит к неизвестному семейству цитокинов. IL-34 человека синтезируется в виде предшественника из 242 аминокислот (АК), который содержит сигнальную последовательность из 20 АК, и приводит к образованию зрелой цепи из 222 АК. Используемый в контексте данного документа термин IL-34 относится к зрелой цепи. Зрелая цепь содержит один потенциальный сайт N-гликозилирования. IL-34 человека на 71% идентичен IL-34 мыши на аминокислотном уровне. IL-34 экспрессируется в различных тканях, в том числе в сердце, головном мозге, печени, почках, селезенке, тимусе, яичках, яичниках, тонком кишечнике, предстательной железе и толстой кишке, и наиболее распространен в селезенке. «h IL-34» или «IL-34 человека» при использовании в контексте данного документа в отношении полипептида IL-

34, если не указано иное, относится к IL-34 человека дикого типа и предпочтительно имеет аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 41, которая представляет собой зрелый IL-34 с удаленной лидерной последовательностью. (См., например, Lin et.al., Science (2008) Vol. 320, Issue 5877, pp. 807-811).

Иллюстративный IL-34 человека (включая последовательность сигнального пептида из 20 АК, которую удаляют для получения зрелого полипептида) представляет собой:

MPRGFTWLRYLGI FLGVALGNEPLEMWPLTQNEECTVTGFLRDKLQYRSRLQY
MKHYFPI NYKISVPYEGVFRIANVTRLQRAQVSERELRYLWVLVSLSATES
VQDVLLEGHP SWKYLQEVETLLLNVQQGLTDVEVSPKVESVLSLLNAPGPNLKLVRPK
ALLDNCFRVMELLYCSCCKQSSVLNWQDCEVPSQSCSPEPSLQYAATQLYPPPPWSPS
SPPHSTGSRPVRAQGEGLLP

(SEQ ID NO: 41, см. ссылку на последовательность в NCBI № NP_689669.2, 1 марта 2018 г.).

Согласно некоторым аспектам данного изобретения предложены антитела против IL-34 мыши, включая мышинные нейтрализующие антитела против IL-34, которые связывают IL-34, представленный в SEQ ID NO. 42. Иллюстративный мышинный IL-34 (включая последовательность сигнального пептида из 20 АК, которую удаляют для получения зрелого полипептида):

MPWGLAWLYCLGILLDVALGNENLEIWTLTQDKECDLTGYLRGKLQYKNRLQY
MKHYFPIN YRIAVPYEGVLRVANITRLQKAHV SERELRYLWVLVSLNATESVMDVLE
GHPSWKYLQEVQTLE NVQRSLMDVEIGPHVEAVLSLLSTPGLSLKLVRPKALLDNCFR
VMELLYCSCCKQSPILKWQDCELPRLHPHSPGSLMQCTATNVYPLSRQTPTSLPGSPSSS
HGSLP

(SEQ ID NO: 42, см. ссылку на последовательность в NCBI № NP_001128572.1, 1 марта 2018 г.).

Используемый в контексте данного документа термин «человеческое антитело против IL-34» или «антитело против IL-34 человека» относится к антителу, которое связывается с IL-34 человека и при введении *in vitro* или *in vivo* обеспечивает ответ, нейтрализующий и/или блокирующий активность IL-34, например, значительное снижение по меньшей мере одной желаемой активности, например, желаемое снижение передачи сигнала IL-34, о чем свидетельствует изменение реагирующей на IL-34 молекулярной или клеточной конечной точки. Например, количество, плотность или фенотип микроглии в ЦНС является примером молекулярного или клеточного эффекта, реагирующего на IL-34. Используемые в контексте данного документа термины «передача сигнала» и «трансдукция

сигнала» и «IL-34-опосредованный», поскольку они относятся к IL-34, относятся к клеточным и/или межклеточным ответам, которые являются результатом активности IL-34.

Термин «антитело» в контексте данного документа относится к молекуле иммуноглобулина, которая связывает антиген. Варианты реализации антитела включают моноклональное антитело, поликлональное антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело или конъюгированное антитело. Антитела могут относиться к любому классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA) и любому подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Иллюстративное антитело представляет собой антитело типа иммуноглобулина G (IgG), состоящее из четырех полипептидных цепей: двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), которые сшиты посредством межцепочечных дисульфидных связей. LC классифицируют как каппа или лямбда, каждая из которых характеризуется определенной константной областью. Варианты реализации данного изобретения могут включать антитело IgG1 или IgG4, а также легкие цепи каппа или легкие цепи лямбда. Предпочтительно антитела по данному изобретению содержат константные области легкой цепи, которые представляют собой константные области каппа.

HC классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon, и определяют изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, соответственно. Аминоконцевая часть каждой из четырех полипептидных цепей включает переменную область из около 100-125 или более аминокислот, в первую очередь, отвечающую за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой из четырех полипептидных цепей содержит константную область, в первую очередь, отвечающую за эффекторные функции. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелых цепей содержит домены CH1, CH2 и CH3. CH1 идет после HCVR; CH1 и HCVR образуют часть тяжелой цепи антигенсвязывающего (Fab) фрагмента, который является частью антитела, которая связывает антиген (антигены). CH2 идет после шарнирной области и перед CH3. CH3 идет после CH2 и находится на карбоксиконце тяжелой цепи. Константная область легких цепей содержит один домен, CL. CL идет после LCVR; при этом CL и LCVR образуют часть легкой цепи Fab.

Антитела по данному изобретению содержат HC IgG, которые можно дополнительно разделить на подклассы, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, и варианты реализации данного изобретения могут включать одну или более модификаций в константной области каждой HC, например, которые усиливают или снижают эффекторную функцию. Используемый в контексте данного документа термин «Fc-область» относится к области антитела, которая содержит домены CH2 и CH3 тяжелой цепи антитела. Fc-область, необязательно, может включать часть шарнирной области или всю

шарнирную область тяжелой цепи антитела. Известно, что IgG1 индуцирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ, ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ, CDC), а мутации Fc, описанные в данном документе, могут уменьшать агрегацию, уменьшать или усиливать активность АЗКЦ или КЗЦ (или другие функции) и/или модифицировать фармакокинетику антител. Варианты реализации антител против IL-34 человека, описанные в данном документе, имеют пониженное связывание с рецепторами FcγR и C1q, тем самым снижая или устраняя цитотоксичность, которая может быть индуцирована антителами с Fc-областями IgG дикого типа. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации данного изобретения мутации вносят в Fc-область в положениях, описанных в данном документе. Безопасность пациента может быть повышена за счет значимого снижения или устранения эффекторных функций таких антител против IL-34 человека, содержащих модифицированную Fc-область, и в сочетании с другими свойствами, описанными в данном документе, позволяет использовать терапевтические средства с улучшенным профилем полезной активности, избегая при этом нежелательной активности.

При экспрессии в определенных биологических системах антитела являются гликозилированными в Fc-области. Как правило, гликозилирование происходит в Fc-области антитела в высококонсервативном участке N-гликозилирования. N-гликаны, как правило, присоединяются к аспарагину. Антитела также могут быть гликозилированы в других положениях. Антитела по данному изобретению представляют собой моноклональные антитела. Моноклональные антитела представляют собой антитела, полученные из единственной копии или клона, включая, например, любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, и не определяются способом, которым они получены. Моноклональные антитела могут быть получены, например, с помощью гибридных технологий, рекомбинантных технологий, технологий фагового дисплея, синтетических технологий, например, CDR-трансплантации, или комбинаций таких или других технологий, известных в данной области техники. Данное изобретение предполагает, что антитела по данному изобретению представляют собой антитела человека или гуманизированные антитела. В контексте моноклональных антител термины «человек» и «гуманизированный» хорошо известны специалистам в данной области техники (Weiner LJ, J. Immunother. 2006; 29: 1-9; Mallbris L, et al., J. Clin. Aesthet. Dermatol. 2016; 9: 13-15). Иллюстративные варианты реализации антител по данному изобретению также включают фрагменты антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат по меньшей мере часть антитела, сохраняющую способность специфично взаимодействовать с

антигеном, такие как фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv-фрагменты антитела, дисульфид-связанные Fv (sdFv), Fd-фрагмент и линейные антитела.

Аминоконцевая часть каждой LC и HC содержит вариабельную область из около 100-120 аминокислот, в первую очередь отвечающую за распознавание антигена содержащимися в ней CDR. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на участки гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с участками, которые являются более консервативными и называются каркасными участками (FR). CDR экспонируются на поверхности белка и являются важными участками антитела для специфичности связывания антигена. Каждая VL и VH состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В данном документе три CDR тяжелой цепи обозначены как «HCDR1, HCDR2 и HCDR3», а три CDR легкой цепи обозначены как «LCDR1, LCDR2 и LCDR3». CDR содержат большинство остатков, которые формируют специфичные взаимодействия с антигеном. На функциональную способность антитела связывать определенный антиген в значительной степени влияют шесть CDR. Отнесение аминокислотных остатков к CDR может быть выполнено в соответствии с хорошо известными схемами, в том числе описанными у Kabat (Kabat et al., «Sequences of Proteins of Immunological Interest», National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)), Chothia (Chothia et al., «Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins», *Journal of Molecular Biology*, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani et al., «Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins», *Journal of Molecular Biology*, 273, 927-948 (1997)), North (North et al., «A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations», *Journal of Molecular Biology*, 406, 228-256 (2011)) или IMGT (международной базе данных ImMunoGeneTics, доступной на сайте www.imgt.org; см. Lefranc et al., *Nucleic Acids Res.* 1999; 27:209-212).

Для целей данного изобретения, за исключением случаев, когда указано иное, определения CDR по North используют для антител против IL-34, описанных в данном документе, и отнесения аминокислот к доменам CDR в областях LCVR и HCVR. Ниже представлена таблица последовательностей CDR для Антитела 1, основанная на определениях по North. Специалист в данной области техники может также применить альтернативные определения по Kabat, Chothia и/или IMGT, чтобы указать CDR в соответствии с этими системами нумерации для антител по данному изобретению, включая Антитела 1-3 в Таблице 1.

Примеры CDR Антитела 1 (или Антител по данному изобретению)						
Ат	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
North	AASGFTFS SYATS (SEQ ID NO: 5)	AISHSGR STYYADS VKG (SEQ ID NO: 6)	ARGRSSL DT (SEQ ID NO: 7)	RASQSI SSAYLA (SEQ ID NO: 8)	YASSIR PT (SEQ ID NO: 9)	SQYGDS LS (SEQ ID NO: 10)

Варианты антител по данному изобретению обладают комбинацией нескольких фармакологически полезных и важных активностей и в некотором отношении способны связываться с высокой аффинностью с IL-34 человека и высокой специфичностью с IL-34 человека, а также обладают другими полезными свойствами. Используемые в контексте данного документа термины «связывают» и «связывает» предназначены для обозначения, если не указано иное, способности белка или молекулы образовывать взаимодействие на основании притяжения с другим белком или молекулой, что приводит к близости двух белков или молекул, как определено обычными способами, известными в данной области техники. Фраза «специфически связывает», используемая в контексте данного документа в отношении аффинности антитела против IL-34 к IL-34 человека, означает, если не указано иное, KD предпочтительно менее около 1×10^{-11} М, еще более предпочтительно от около 1×10^{-11} М до около 1×10^{-12} М, как определено общепринятыми способами, известными в данной области техники, в том числе с использованием биосенсора ППР и/или MSD, по существу, как описано в данном документе. Фраза «специфически связывает» также указывает на относительную аффинность антитела против IL-34 к IL-34 человека по сравнению с другими антигенами, при этом аффинность к IL-34 человека приводит к специфическому распознаванию IL-34 человека.

Варианты реализации антитела по данному изобретению могут быть экспрессированы и получены с помощью различных способов, известных в данной области техники, из конструкций, содержащих последовательности вариантов реализации антитела по данному изобретению. Термины «нуклеиновая кислота» или «полинуклеотид», используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к полимерам нуклеотидов, включая одноцепочечные и/или двухцепочечные молекулы, содержащие нуклеотиды, такие как молекулы ДНК, кДНК и РНК, включающие нативные, модифицированные нуклеотиды и/или их аналоги. Полинуклеотиды по данному изобретению также могут включать субстраты, включенные в них, например, ДНК- или РНК-полимеразой или

синтетической реакцией. Молекула ДНК по данному изобретению представляет собой молекулу ДНК, которая содержит не встречающуюся в природе полинуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, имеющий аминокислотную последовательность по меньшей мере одного из полипептидов в антителе по данному изобретению (например, тяжелая цепь, легкая цепь, переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи).

Выделенная ДНК, кодирующая область HCVR или LCVR, может быть преобразована в ген полноразмерной тяжелой цепи путем функционального соединения соответствующей ДНК, кодирующей HCVR или LCVR, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные области тяжелой или легкой цепи, с образованием тяжелой или легкой цепи, соответственно. Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека, а также других млекопитающих, известны в данной области техники. Фрагменты ДНК, охватывающие эти области, можно получить, например, с помощью стандартной ПЦР-амплификации.

Полинуклеотиды по данному изобретению могут быть экспрессированы в клетке-хозяине после функционального соединения указанных последовательностей с последовательностью контроля экспрессии. Векторы экспрессии, как правило, реплицируются в организмах-хозяевах либо как эписомы, либо как неотъемлемая часть хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии будут содержать селективные маркеры, например, тетрациклин, неомицин и дигидрофолатредуктазу, чтобы обеспечить возможность детектирования тех клеток, которые трансформированы целевыми последовательностями ДНК. Векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотидные последовательности (например, полинуклеотиды, кодирующие полипептиды антитела и последовательности контроля экспрессии), могут быть перенесены в клетку-хозяина с помощью хорошо известных способов, которые изменяются в зависимости от типа клетки-хозяина.

Антитела по данному изобретению можно легко получить в клетках млекопитающих, неограничивающие примеры которых включают клетки CHO, NS0, HEK293 или COS. Клетки-хозяева культивируют с использованием технологий, хорошо известных в данной области техники. Экспрессия антител у млекопитающих, как правило, приводит к гликозилированию. Гликозилирование антител, как правило, бывает N-связанным или O-связанным. N-связанное гликозилирование относится к присоединению углеводной группы к боковой цепи остатка аспарагина. O-связанное гликозилирование относится к присоединению сахара, например, N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикарбоксильной кислоте. Как правило, гликозилирование происходит в Fc-

области антитела в высококонсервативном участке N-гликозилирования (например, положении 297 в IgG1 согласно нумерации IMGT или индекса EU). Сайты гликозилирования можно модифицировать для изменения гликозилирования (например, путем блокирования или уменьшения гликозилирования или изменения аминокислотной последовательности для получения дополнительного или разнообразного гликозилирования).

Экспрессия антител подклассов IgG у млекопитающих может привести к отсечению С-концевых аминокислот одной или обеих тяжелых цепей; например, для антител IgG1 могут быть удалены одна или две С-концевые аминокислоты. Для антител IgG1, если присутствует С-концевой лизин, он может быть отсечен или вырезан из тяжелой цепи во время экспрессии. Кроме того, предпоследний глицин также может быть отсечен или вырезан из тяжелой цепи.

Экспрессия антител у млекопитающих также может приводить к модификации N-концевых аминокислот. Например, когда наиболее N-концевая аминокислота тяжелой цепи или легкой цепи представляет собой глутамин, она может быть модифицирована в пироглутаминовую кислоту.

Антитело по данному изобретению или фармацевтическую композицию, содержащую его, можно вводить парентеральными путями, неограничивающими примерами которых являются подкожное введение и внутривенное введение. Антитело по данному изобретению может быть введено пациенту совместно с фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями или эксципиентами в виде однократной или многократных доз. Фармацевтические композиции по данному изобретению можно приготовить с помощью способов, хорошо известных в данной области техники (например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd ed. (2012), A. Loyd et al., Pharmaceutical Press), и содержат антитело, как раскрыто в данном документе, и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов.

Применения вариантов антител по данному изобретению:

Согласно некоторым вариантам реализации данного изобретения антитела против IL-34 по данному изобретению применимы для лечения иммуноопосредованных заболеваний. Используемые в контексте данного документа термины «иммуноопосредованное заболевание» или «воспалительное заболевание или расстройство» используются взаимозаменяемо и относятся к нежелательным состояниям, возникающим из-за несоответствующих или чрезмерных иммунных ответов, при которых ингибирование IL-34 приводит к более гомеостатическому и менее патологическому

ответу. Предполагается, что термин «иммуноопосредованное заболевание» или «воспалительное расстройство» включает такие состояния, независимо от того, опосредованы ли они микроглиальными или макрофагальными клеточными иммунными реакциями, или реакциями подобных типов резидентных клеток тканей, таких как гистиоциты, клетки Купфера, альвеолярные макрофаги, кишечные макрофаги, макрофагоподобные синовиоциты или клетки Лангерганса. Иллюстративные заболевания, которые предполагается лечить с помощью антител по данному изобретению, описанных в данном документе, включают болезнь Альцгеймера; таупатию; синдром Шегрена (СШ); ревматоидный артрит (РА); воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), атопический дерматит, заболевание почек, сепсис и/или неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП).

В некоторых более конкретных вариантах реализации данного изобретения иммуноопосредованное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера (БА). Согласно другим вариантам реализации данного изобретения антитела против IL-34 могут быть использованы в диагностических применениях для иммуноопосредованных заболеваний. В некоторых вариантах реализации данного изобретения иммуноопосредованные заболевания представляют собой по меньшей мере одно из: БА; синдром Шегрена (СШ); ревматоидный артрит (РА); воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), атопический дерматит, заболевание почек, сепсис и/или неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП).

Данное изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитело против IL-34 согласно данному изобретению, и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов. Кроме того, в данном изобретении предложен способ лечения иммуноопосредованного заболевания, такого как БА; синдром Шегрена (СШ); ревматоидный артрит (РА); воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), атопический дерматит, заболевание почек, сепсис и/или неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), включающий введение нуждающемуся в этом пациенту фармацевтической композиции по данному изобретению.

Кроме того, в данном изобретении предложен способ лечения иммуноопосредованных заболеваний. Более конкретно, в данном изобретении предложен способ лечения иммуноопосредованных заболеваний, включая БА; синдром Шегрена (СШ); ревматоидный артрит (РА); воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), атопический дерматит, заболевание почек, сепсис и/или неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антитела против IL-34 по данному изобретению.

В данном изобретении также предложено антитело против IL-34 по данному изобретению для применения в терапии. Более конкретно, в данном изобретении предложено антитело против IL-34 по данному изобретению для лечения иммуноопосредованных заболеваний, включая БА; синдром Шегрена (СШ); ревматоидный артрит (РА); воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), атопический дерматит, заболевание почек, сепсис и/или неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП).

В некоторых вариантах реализации данного изобретения в данном изобретении предложено применение антитела против IL-34 по данному изобретению в производстве лекарственного средства для лечения одного или более иммуноопосредованных заболеваний, включая БА; синдром Шегрена (СШ); ревматоидный артрит (РА); воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), атопический дерматит, заболевание почек, сепсис и/или неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП).

Антитела по данному изобретению применимы для идентификации иммуноопосредованных нарушений, при которых IL-34 может способствовать этиопатогенезу расстройства. В дополнительных вариантах реализации данного изобретения предложен способ лечения иммуноопосредованного заболевания у пациента. Такие способы включают этапы контактирования образца пациента с антителом против IL-34 и обнаружения связывания между IL-34 человека в образце пациента и антителом; и диагностирование у пациента наличия заболевания; риск развития заболевания; необходимость в лечении; и/или риск развития симптомов, связанных с иммуноопосредованным заболеванием, когда в образце пациента обнаруживается наличие IL-34 в количестве, которое превышает контрольное значение, наблюдаемое у здоровых людей (см., например, Xie, H.H., et al. *Elevated Serum Interleukin-34 Level in Patients with Systemic Lupus Erythematosus Is Associated with Disease Activity*. Sci Rep 8, 3462 (2018)). Согласно некоторым более конкретным вариантам реализации способов лечения, предложенных в данном документе, такие способы дополнительно включают этапы определения референтного значения, включая дополнительные этапы контактирования контрольного стандарта с первым антителом, которое связывает ту же область первого эпитопа IL-34, что и используется при контактировании с образцом пациента; контактирование контрольного стандарта со вторым антителом, имеющим детектируемую метку и связывающим ту же самую область второго эпитопа IL-34, которая используется при контактировании с образцом пациента; и детектирование сигнала, обеспечиваемого обнаруживаемым сигналом. В некоторых конкретных вариантах реализации данного изобретения антитело против IL-34 содержит комбинацию CDR LC и HC, представленную в Таблице 1. В дополнительных вариантах реализации данного изобретения второе

антитело содержит комбинацию LCVR и HCVR, представленную в Таблице 1. Согласно некоторым вариантам реализации данного изобретения референтное значение составляет приблизительно 10-30 пг/мл, например, для лизатов тканей ЦНС. В некоторых вариантах реализации данного изобретения иммуноопосредованное заболевание представляет собой одно из: БА; синдром Шегрена (СШ); ревматоидный артрит (РА); воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), атопический дерматит, заболевание почек, сепсис и/или неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП). В некоторых вариантах реализации данного изобретения образец пациента представляет собой один из образцов ЦСЖ, крови, сыворотки, лизата ткани или плазмы. Согласно некоторым вариантам реализации данного изобретения способ дополнительно включает этапы контактирования образца пациента со вторым антителом против IL-34, которое связывает область второго эпитопа IL-34 и имеет детектируемую метку, и детектирование сигнала, обеспечиваемого обнаруживаемым сигналом. В дополнительных вариантах реализации данного изобретения второе антитело содержит комбинацию CDR LC и HC, представленную в Таблице 1. В дополнительных вариантах реализации данного изобретения второе антитело содержит комбинацию LCVR и HCVR, представленную в Таблице 1. Согласно некоторым вариантам реализации данного изобретения первое и второе антитела против IL-34 не связываются друг с другом.

Согласно некоторым вариантам реализации данного изобретения в данном изобретении предложен способ обнаружения IL-34 в образце пациента, включающий этапы контактирования образца пациента с первым антителом, которое связывает область первого эпитопа IL-34; контактирование образца пациента со вторым антителом, которое связывает область второго эпитопа IL-34 и имеет детектируемую метку; и детектирование сигнала, обеспечиваемого указанной детектируемой меткой. В некоторых вариантах реализации данного изобретения образец пациента представляет собой один из образцов крови, сыворотки, лизата ткани или плазмы. Согласно некоторым более конкретным вариантам реализации данного изобретения область первого эпитопа IL-34 частично перекрывается с областью второго эпитопа IL-34. Кроме того, в некоторых вариантах реализации данного изобретения указанные этапы контактирования с первым и вторым антителами происходят одновременно. В некоторых конкретных вариантах реализации данного изобретения первое антитело содержит комбинацию CDR LC и HC, представленную в Таблице 1. В дополнительных вариантах реализации данного изобретения первое антитело содержит комбинацию LCVR и HCVR, представленную в Таблице 1.

Согласно некоторым вариантам реализации данного изобретения предложен способ количественного определения IL-34 в образце пациента. Такой способ включает этапы контактирование образца пациента с первым антителом, которое связывает область первого

эпитопа IL-34; контактирование образца пациента со вторым антителом, которое связывает область второго эпитопа IL-34 и имеет детектируемую метку; и обнаружение сигнала, обеспечиваемого указанной детектируемой меткой; контактирование контрольного стандарта с первым антителом, которое связывает ту же область первую эпитопа IL-34 (которая используется при контактировании с образцом пациента); контактирование контрольного стандарта со вторым антителом, которое связывается с той же областью второго эпитопа IL-34 (которая используется при контактировании с образцом пациента) и имеет детектируемую метку; и детектирование сигнала, обеспечиваемого упомянутым обнаруживаемым сигналом. В некоторых вариантах реализации данного изобретения образец пациента представляет собой один из образцов крови, сыворотки или плазмы или лизата ткани. Согласно некоторым более конкретным вариантам реализации данного изобретения область первого эпитопа IL-34 частично перекрывается с областью второго эпитопа IL-34. Кроме того, в некоторых вариантах реализации данного изобретения указанные этапы контактирования с первым и вторым антителами происходят одновременно. В некоторых конкретных вариантах реализации данного изобретения первое антитело содержит комбинацию CDR LC и HC, представленную в Таблице 1. В дополнительных вариантах реализации данного изобретения первое антитело содержит комбинацию LCVR и HCVR, представленную в Таблице 1. В некоторых конкретных вариантах реализации данного изобретения второе антитело содержит комбинацию CDR LC и HC, представленную в Таблице 1. В дополнительных вариантах реализации данного изобретения второе антитело содержит комбинацию LCVR и HCVR, представленную в Таблице 1.

Согласно некоторым вариантам реализации данного изобретения предложен способ диагностирования иммуноопосредованного заболевания. Такой способ включает этапы контактирования образца пациента с антителом против IL-34 и детектирование связывания между IL-34 в образце пациента и антителом. Согласно некоторым конкретным вариантам реализации данного изобретения способ диагностирования включает диагностирование у пациента наличия заболевания; риск развития; необходимость в лечении; и/или риск появления симптомов, связанных с иммуноопосредованным заболеванием, когда в образце пациента обнаруживается наличие IL-34 выше контрольного значения. Согласно некоторым более конкретным вариантам реализации данного изобретения такие способы дополнительно включают этапы определения референтного значения, включая этапы контактирования контрольного стандарта с первым антителом, которое связывает ту же область первого эпитопа IL-34, что и используется при контактировании с образцом пациента; контактирование контрольного стандарта со вторым антителом, имеющим

детектируемую метку и связывающим ту же самую область второго эпитопа IL-34, которая используется при контактировании с образцом пациента; и детектирование сигнала, обеспечиваемого обнаруживаемым сигналом. В некоторых вариантах реализации данного изобретения первое антитело содержит комбинацию CDR LC и HC, представленную в Таблице 1. Некоторые варианты реализации способа диагностирования иммуноопосредованного заболевания, предложенного в данном документе, дополнительно включают этапы контактирования образца пациента со вторым антителом против IL-34, которое связывает область второго эпитопа IL-34 и имеет детектируемую метку; и детектирование сигнала, обеспечиваемого детектируемой меткой. В некоторых конкретных вариантах реализации данного изобретения антитело против IL-34 содержит комбинацию CDR LC и HC, представленную в Таблице 1. В дополнительных вариантах реализации данного изобретения антитело содержит комбинацию LCVR и HCVR, представленную в Таблице 1. Согласно конкретным вариантам реализации данного изобретения область первого эпитопа IL-34 частично перекрывается с областью второго эпитопа IL-34. Согласно некоторым вариантам реализации данного изобретения первое и второе антитело не связываются друг с другом. Согласно дополнительным вариантам реализации данного изобретения референтное значение составляет около 10-30 пг/мл для лизатов тканей ЦНС и/или определяется специалистом в данной области техники для соответствующей референтной группы и источника образца. В дополнительных вариантах реализации данного изобретения иммуноопосредованное заболевание представляет собой одно из: БА; таупатию; синдром Шегрена (СШ); ревматоидный артрит (РА); воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), атопический дерматит, заболевание почек, сепсис и/или неалкогольную жировую болезнь печени (НАЖБП).

В одном варианте реализации данного изобретения предложен способ определения уровня IL-34 человека в биологической жидкости, включающий: (а) контактирование биологической жидкости с диагностическим моноклональным антителом против IL-34 человека или его антигенсвязывающим фрагментом, которые специфически связываются с IL-34 человека, и содержат аминокислотную последовательность, как в SEQ ID NO: 41, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащими: области, определяющие комплементарность, легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 8), (SEQ ID NO: 9) и (SEQ ID NO: 10), соответственно, и области, определяющие комплементарность, тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 15), (SEQ ID NO: 16) и (SEQ ID NO: 17), соответственно; (b) необязательно удаление любого неспецифически связанного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента; и (с) детектирование и/или количественная оценка количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связаны с IL-34 человека. Предпочтительно, при этом указанная биологическая жидкость представляет собой кровь, сыворотку или плазму или спинномозговую жидкость, и указанное контактирование происходит *ex vivo*.

Таупатии включают, но не ограничиваются, болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Пика (БП), прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП), кортикобазальную дегенерацию (КБД), аргирофильную зернистую болезнь, синдром Дауна, хроническую травматическую энцефалопатию (ХТЭ), черепно-мозговую травму (ЧМТ), лобно-височная деменция с паркинсонизмом, сцепленным с хромосомой 17 (ЛВДП-17), Гуамский комплекс паркинсонизма-деменции, болезнь Нимана-Пика типа С, миотоническую дистрофию (см. Li, C., Götz, J. *Tau-based therapies in neurodegeneration: opportunities and challenges*. Nat Rev Drug Discov 16, 863–883 (2017)).

В вариантах реализации данного изобретения пациент представляет собой человека, у которого был диагностирован медицинский риск, состояние или расстройство, такое как одно из заболеваний или расстройств, описанных в данном документе, и который нуждается в лечении с использованием антитела, описанным в данном документе. В тех случаях, когда расстройства, которые можно лечить с помощью способов по данному изобретению, известны по установленным и принятым классификациям, например болезнь Альцгеймера; таупатия; синдром Шегрена (СШ); ревматоидный артрит (РА); воспалительное заболевание кишечника (ВЗК), атопический дерматит, заболевание почек, сепсис и/или неалкогольная жировая болезнь печени (НАЖБП), их классификации могут быть найдены в разных хорошо известных медицинских источниках. Например, в настоящее время 5-е издание Диагностического и статистического руководства по психическим нарушениям (DSM-5) предоставляет диагностический инструмент для идентификации некоторых нарушений, описанных в данном документе. Кроме того, классификация некоторых расстройств, описанных в данном документе, представлена в Международной классификации заболеваний, десятом пересмотренном издании (ICD-10). Специалист в данной области техники поймет, что существуют альтернативные номенклатуры, нозологии и системы классификации для заболеваний или расстройств, описанных в данном документе, включая те, которые описаны в DSM-5 и ICD-10, и что системы терминологии и классификации развиваются с развитием медицинской науки.

Термин «процесс лечения» (или «лечить», или «лечение») относится к замедлению, прерыванию, приостановке, облегчению, прекращению, уменьшению или обращению

вспять прогрессирования или тяжести существующего симптома, расстройства, состояния или заболевания.

Используемый в контексте данного документа термин «врожденный иммунитет» включает часть иммунного ответа, которая, в отличие от адаптивной части иммунного ответа, требуется для инициирования и поддержания адаптивного иммунного ответа (ответы антител и Т-клеточные ответы).

«Эффективное количество» означает такое количество антитела против PL-34 человека по данному изобретению или фармацевтической композиции, содержащей такое антитело, которое вызывает биологический или клинический ответ или необходимый терапевтический эффект в ткани, системе, организме животного, млекопитающего или человека, который предполагается исследователем, врачом или другим медицинским работником. Используемый в контексте данного документа термин «эффективный ответ» пациента или «ответ» пациента на лечение относится к клинической или терапевтической пользе, которую пациент получает при введении антитела по данному изобретению. Эффективное количество антитела может изменяться в зависимости от таких факторов как патологическое состояние, возраст, пол и масса индивидуума, и способности антитела вызывать целевой ответ у индивидуума. Эффективное количество также является таким, при котором любой токсический или вредный эффект антитела перевешивается терапевтически благоприятными эффектами. Такая польза включает любое одно или более из следующего: снижение уровня воспаления или иммунной активации, стабилизация иммуноопосредованного заболевания или расстройства; или улучшение признаков или симптомов иммуноопосредованного расстройства. В альтернативном варианте такая польза включает в себя любое одно или более из следующих явлений: повышенную иммунную толерантность трансплантированных органов; стабилизированное аутоиммунное заболевание или расстройство; или ослабление признаков или симптомов аутоиммунного расстройства.

Потенциальным преимуществом способов, описанных в данном документе, является возможность достижения выраженного и/или длительного облегчения состояния у пациента, страдающего иммуноопосредованным заболеванием или нейровоспалительным заболеванием, с приемлемым профилем безопасности, включающим приемлемую переносимость, уровень токсичности и/или нежелательные явления, так что пациент получает пользу от способа лечения в целом. Эффективность лечения по данному изобретению может быть измерена с помощью различных конечных точек, которые обычно используются при оценке лечения различных иммуноопосредованных расстройств. Необязательно могут применяться различные другие подходы к определению

эффективности любой конкретной терапии по данному изобретению, включая, например, маркеры активации иммунных клеток, показатели воспаления, визуализацию измерения зависимых от клеточного цикла биомаркеров и/или измерение ответа иммунных или тканеспецифических биомаркеров.

Эффективное количество может быть легко определено специалистом в данной области техники путем применения известных способов и путем анализа результатов, полученных при аналогичных обстоятельствах. Эффективное количество антитела против ПЛ-34 человека по данному изобретению можно вводить в виде однократной дозы или многократных дозах. Кроме того, эффективное количество антитела по данному изобретению можно вводить в виде многократных доз в количествах, которые были бы меньше эффективного количества, если бы его не вводили более одного раза. При определении эффективного количества для пациентов лечащий врач учитывает множество факторов, включая, но не ограничиваясь: конституцию пациента (например, вес или массу), площадь поверхности тела, возраст и общее состояние здоровья; конкретное рассматриваемое заболевание или расстройство; степень или вовлечение в патологический процесс, или тяжесть заболевания или расстройства; ответ конкретного пациента; конкретное вводимое соединение; способ введения; характеристики биодоступности вводимого препарата; выбранную схему лечения; применение сопутствующего препарата и другие значимые обстоятельства, известные врачам.

Еженедельная доза, доза раз в две недели, ежемесячная или ежеквартальная доза для парентерального (включая, но не ограничиваясь, подкожное, внутримышечное и/или внутривенное) введения может составлять от около 0,5 мг/кг до около 50 мг/кг.

Еженедельная доза, доза раз в две недели, ежемесячная или ежеквартальная доза для парентерального (включая, но не ограничиваясь, подкожное, внутримышечное и/или внутривенное) введения может составлять от около 0,5 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 1 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 2 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 3 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 4 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 5 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 6 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 7 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 8 мг/кг до около 10 мг/кг, от около 1 мг/кг до около 8 мг/кг, от около 2 мг/кг до около 8 мг/кг, от около 3 мг/кг до около 8 мг/кг, от около 4 мг/кг до около 8 мг/кг, от около 5 мг/кг до около 8 мг/кг, от около 6 мг/кг до около 8 мг/кг, от около 1 мг/кг до около 6 мг/кг, от около 2 мг/кг до около 6 мг/кг, от около 3 мг/кг до около 6 мг/кг, от около 4 мг/кг до около 6 мг/кг, от около 5 мг/кг до около 6 мг/кг, от около 1 мг/кг до около 5 мг/кг, от около 2 мг/кг до около 5 мг/кг, от около 3 мг/кг до около 5 мг/кг, от около 4 мг/кг до около 5 мг/кг, от около 1 мг/кг до около 4 мг/кг, от

около 2 мг/кг до около 4 мг/кг, от около 3 мг/кг до около 4 мг/кг, от около 3,5 мг/кг до около 5 мг/кг или от около 4 мг/кг до около 5 мг/кг.

Еженедельная доза, доза раз в две недели, ежемесячная или ежеквартальная доза для парентерального (включая, но не ограничиваясь, подкожное, внутримышечное и/или внутривенное) введения может составлять, например, от около 50 мг до около 500 мг, от около 75 мг до около 500 мг, от около 100 мг до около 500 мг, от около 125 мг до около 500 мг, от около 250 мг до около 500 мг, от около 300 мг до около 500 мг, от около 350 мг до около 500 мг, от около 400 мг до около 500 мг, от около 450 мг до около 500 мг, от около 50 мг до около 400 мг, от около 75 мг до около 400 мг, от около 100 мг до около 400 мг, от около 125 мг до около 400 мг, от около 250 мг до около 400 мг, от около 300 мг до около 400 мг, от около 350 мг до около 400 мг, от около 50 мг до около 300 мг, от около 75 мг до около 300 мг, от около 100 мг до около 300 мг, от около 125 мг до около 300 мг, от около 150 мг до около 300 мг, от около 175 мг до около 300 мг, от около 200 мг до около 300 мг, от около 250 мг до около 300 мг, от около 50 мг до около 250 мг, от около 75 мг до около 250 мг, от около 100 мг до около 250 мг, от около 125 мг до около 250 мг, от около 150 мг до около 250 мг, от около 175 мг до около 250 мг, от около 200 мг до около 250 мг, от около 75 мг до около 250 мг, от около 50 мг до около 200 мг, от около 75 мг до около 200 мг, от около 100 мг до около 200 мг, от около 125 мг до около 200 мг, от около 150 мг до около 200 мг, от около 175 мг до около 200 мг, от около 50 мг до около 175 мг, от около 75 мг до около 175 мг, от около 100 мг до около 175 мг, от около 125 мг до около 175 мг или от около 150 мг до около 175 мг.

Однако также предусмотрены дозы ниже или выше доз, указанных в данном документе, особенно с учетом факторов, которые необходимо учитывать при дозировке, известных специалисту в этой области техники и/или описанных в данном документе. Прогресс у пациента, получающего лечение, можно контролировать путем периодической оценки и при необходимости корректировать дозу.

Потенциальным преимуществом описанных в данном документе способов является возможность достижения выраженного и/или длительного облегчения состояния у пациента, страдающего иммуноопосредованным заболеванием или нейровоспалительным заболеванием, с приемлемым профилем безопасности, включающим приемлемую переносимость, уровень токсичности и/или нежелательные явления, так что пациент получает пользу от способа лечения в целом, и, более конкретно, антитела по данному изобретению обеспечивают эффективное лечение, избегая при этом клинически нежелательной иммуносупрессии и/или иммуноассоциированных нежелательных явлений, таких как «цитокиновый шторм» или значительное высвобождение цитокинов. Антитела

по данному изобретению могут быть применимы для лечения цитокинового шторма или иного нежелательного высвобождения цитокинов. Используемый в контексте данного документа термин «значительное высвобождение цитокинов» относится к значимому увеличению измеримого количества цитокинов, которое можно обнаружить способами, известными специалисту в этой области техники. Например, значительное высвобождение цитокинов может быть обнаружено в образцах крови человека путем ИФА, при этом уровни цитокинов в нестимулированной крови сравнивают с уровнями цитокинов в крови, инкубированной с антителом. В некоторых таких исследованиях, например, может быть обнаружено значительное высвобождение цитокинов, если уровни IL-6 или IL-8, или IFN- γ по меньшей мере в три раза выше в крови, инкубированной с антителом, по сравнению с уровнями в нестимулированной крови. Предпочтительно лечение иммуноопосредованного расстройства, как описано в вариантах реализации данного изобретения, будет происходить при отсутствии у пациента значительного высвобождения цитокинов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **Фиг. 1** представлена нейтрализация Антителом 1 активности репортерного гена люциферазы, индуцированной IL-34 человека, в клетках 293 SRE, экспрессирующих hCSF1R.

На **Фиг. 2** представлена способность Антитела 1 нейтрализовать димеризацию CSF1R в анализе димеризации PathHunter eXpress.

На **Фиг. 3** представлена способность Антитела 1 ингибировать фосфорилирование ERK в клетках NIH-3T3/CSF1R.

На **Фиг. 4** представлена способность антител против IL34 ингибировать IL-34-индуцированную экспрессию CD163 в моноцитах человека, исследованная с использованием проточной цитометрии.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры предложены для иллюстрации, но не для ограничения заявленного изобретения. Результаты следующих анализов демонстрируют, что приведенные в качестве примеров моноклональные антитела и/или их антигенсвязывающие фрагменты по данному изобретению связывают и/или нейтрализуют

IL-34 и, следовательно, могут применяться для лечения иммуноопосредованных и воспалительных заболеваний, описанных в данном документе.

Пример 1: Получение, экспрессия и очистка антител

Панель антител против IL-34 человека получают с использованием фаг-дисплейной библиотеки антител человека и подвергают скринингу для идентификации реагентов, которые могут быть эффективными антителами, нейтрализующими IL-34. Мутации систематически вводят в отдельные области, определяющие комплементарность (CDR), каждого антитела, и полученные библиотеки подвергают многократной селекции с уменьшением концентрации антигена и/или увеличением периода диссоциации, чтобы выделить клоны с улучшенной аффинностью. Последовательности отдельных вариантов определяют и используют для создания комбинаторной библиотеки, которая подвергается дополнительному раунду селекции с повышенной строгостью для выявления аддитивных или синергических мутационных пар между отдельными областями CDR. Отдельные комбинаторные клоны секвенируют и определяют характеристики связывания. Для дальнейшего повышения аффинности к IL-34 эти комбинаторные клоны подвергают дополнительным раундам одиночного и комбинаторного мутагенеза. Этот скрининг можно проводить в отношении человеческого или мышинного IL-34 для повышения аффинности в отношении выбранных видов (например, Антитела 1 для IL-34 человека и Антитела 3 для IL-34 мыши). Выбранные антитела также могут быть подвергнуты мутагенезу для исправления посттрансляционных модификаций, таких как окисление метионина, при сохранении аффинности связывания с IL-34. Кроме того, в антителе могут быть сделаны замены каркаса (FW), чтобы вернуть эти последовательности FW1 в состояние зародышевой линии, чтобы снизить потенциальный риск иммуногенности.

Получают сконструированные и/или оптимизированные антитела против IL-34, обозначаемые в данном документе как Антитело 1, Антитело 2 и/или Антитело 3, имеющие аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, а также полные аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей и нуклеотидные последовательности, кодирующие их, как указано ниже в разделе, озаглавленном «Список аминокислотных и нуклеотидных последовательностей». SEQ ID NO, соответствующие этим фрагментам, а также аминокислотные последовательности CDR легкой и тяжелой цепей представлены ниже в Таблице 1.

Иллюстративные антитела против IL-34 согласно данному изобретению могут быть экспрессированы и очищены, по существу, следующим образом. Соответствующую клетку-хозяина, такую как HEK 293, NS0 или CHO, можно временно или стабильно

трансфицировать экспрессионной системой для секреции антител, используя оптимальное, предварительно определенное соотношение векторов HC:LC (такое как 1:3 или 1:2) или одновекторную систему, кодирующую как HC, так и LC. Осветленную среду, в которой секретировали антитело, очищают с помощью любой из многочисленных общепринятых технологий. Например, в случае фрагмента Fab среда может быть нанесена на колонку с Белком А или G, например, колонку MabSelect® (GE Healthcare) или колонку KappaSelect (GE Healthcare), уравновешенную совместимым буфером, таким как фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (уровень pH 7,4). Колонка может быть промыта для удаления неспецифических связывающих компонентов. Связанное антитело можно элюировать, например, градиентом pH (например, от 20 mM Трис-буфера, pH 7,0, до 10 mM цитратного-натриевого буфера, pH 3,0, или от фосфатно-солевого буфера, pH 7,4, до 100 mM глицинового буфера, pH 3,0). Фракции антитела могут быть детектированы, например, с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, а затем могут быть объединены. Связанное антитело элюируют, например, с помощью градиента pH (например, от 0,1 M фосфатно-натриевого буфера с pH 6,8 до 0,1 M цитратно-натриевого буфера с pH 2,5). Фракции антитела детектируют, например, с помощью ДСН-ПААГ электрофореза, и затем объединяют. Дополнительная очистка является необязательной и проводится в зависимости от предполагаемого применения. Антитело может быть сконцентрировано и/или стерильно отфильтровано с использованием общепринятых технологий. Растворимые агрегаты и мультимеры могут быть эффективно удалены с помощью обычных способов, включая эксклюзионную, с гидрофобным взаимодействием или ионообменную, мультимодальную или гидроксиапатитную хроматографию. Чистота антитела после указанных этапов хроматографии составляет более 99%. Продукт может быть незамедлительно заморожен при -70 °C, или может быть лиофилизирован, или сохранен при температуре 4 °C для немедленного использования. SEQ ID NO аминокислотных последовательностей для иллюстративных антител человека согласно данному изобретению представлены ниже в Таблице 1.

Плазмида экспрессии содержит версии кДНК генов LC и HC для Антитела 1 (например, последовательность ДНК SEQ ID NO:12, кодирующую HC приведенного в качестве примера Антитела 1, представленную в Таблице 1, и последовательность ДНК, кодирующую аминокислотную последовательность LC, представленную в Таблице 1, например, последовательность ДНК SEQ ID NO:13, кодирующую LC приведенного в качестве примера Антитела 1, представленную в Таблице 1); и экспрессируются из обычно используемой и подходящей конструкции для этой цели, например, конструкции, основанной на основных немедленно-ранних промоторах цитомегаловируса человека.

Гены LC и HC окружены последовательностями инвертированных концевых повторов (ITR), распознаваемых ферментом транспозазой. Исходную клеточную линию совместно трансфицируют плазмидой экспрессии и мРНК транспозазы, что обеспечивает временную экспрессию фермента транспозазы для обеспечения стабильной интеграции кассеты экспрессии гена Антитела 1 в геномную ДНК.

Отобранную смешанную культуру подвергают клонированию отдельных клеток с использованием технологии сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS). Клонально полученные клеточные линии размножают и подвергают скринингу относительно продуцирования Антитела 1. Выбирают и стабилизируют клонально полученную клеточную линию. Эта клеточная линия получена без использования каких-либо материалов, содержащих компоненты животного происхождения, и используется для производства.

Осветленную среду, в которую было секретировано антитело, наносят на аффинную колонку с Белком А, которая уравновешена совместимым буфером, таким как фосфатно-солевой буфер (рН 7,4) или 20 мМ Трис с 150 мМ хлорида натрия (рН 8,0). Колонку промывают 1 М NaCl для удаления неспецифических связывающих компонентов. Связанное антитело элюируют, например, цитратом натрия при уровне рН (прибл.) 3,5 и фракции нейтрализуют 1 М Трис-буфером. Фракции антитела обнаруживают, например, с помощью ДСН-ПААГ электрофореза или аналитического исключения по размеру, а затем объединяют. Растворимый агрегат и мультимеры могут быть эффективно удалены обычными способами, включая эксклюзионную, гидрофобного взаимодействия, ионообменную или гидроксиапатитную хроматографию. Иллюстративное антитело против IL-34 согласно данному изобретению концентрируют и/или стерильно фильтруют, используя стандартные способы. Чистота иллюстративного антитела после этих этапов хроматографии составляет более 95%. Иллюстративное антитело против IL-34 согласно данному изобретению может быть немедленно заморожено при -70 °C, или храниться при 4 °C в течение нескольких месяцев.

Пример 2: Характеристика антител против IL-34

Аффинность связывания с IL-34 человека

Аффинность связывания моноклональных антител против IL-34 по данному изобретению с IL-34 человека, включающим лидерную последовательность, или со зрелым IL-34 человека, можно определить способами, известными в данной области техники. Если не указано иное, все реагенты и материалы можно приобрести в компании Meso Scale Discovery (MSD®), а измерения можно проводить при температуре 37 °C. Человеческий и

мышинный IL-34 можно получить и очистить с использованием ИМАС и эксклюзионной хроматографии или приобрести у коммерческих поставщиков. Также получают слитый Fc-белок CSF1R человека (например, соединение D), очищают с помощью MabSelect™ SuRe™ (GE Healthcare) и дополнительно очищают с помощью эксклюзионной хроматографии.

Вкратце, обычно серию 2-кратных или 3-кратных разведений IL-34 человека, яванской макаки или мыши готовят из начальной концентрации от 40, или 50, или 60, или 80, или 100, или 120 нМ до 100 фМ; и каждая серия включает пустой контроль IL-34. Образцы готовят в 3% (масс./об.) растворе блокатора А (MSD®, кат. № R93AA-1) и добавляют к каждому образцу фиксированную конечную концентрацию 5-50 пМ каждого приведенного в качестве примера антитела из Таблицы 1. Включен только контроль антител. Объем 50 мкл каждого образца белок-антитело добавляют в отдельные лунки 96-луночного планшета для микротитрования (Greiner, EK-20101). Планшет закрывают оптической клейкой пленкой (Thermo Fisher Scientific, кат. № 4311971) и инкубируют при 37 °C в течение 1-3 дней, чтобы обеспечить уравнивание образца. За день до анализа, каждый ряд 96-луночного стандартного планшета MSD® (MSD®, кат. № L15XA) покрывают 30 мкл соответствующего IL-34 (как используется в титровочной серии) в концентрации 1 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). В день эксперимента стандартный планшет MSD® промывают три раза 150 мкл ФСБТ (PBST, ФСБ с 0,05% Твина) и блокируют 150 мкл 3% раствора блокатора А в течение 60 минут при комнатной температуре при встряхивании 300 обор./мин на настольном шейкере MaxQ 4450 (Thermo Fisher Scientific). После трех промывок ФСБТ, 50 мкл каждого образца белок-антитело (приготовленного и инкубированного, как описано выше) добавляют в стандартный планшет MSD® и инкубируют в течение 150 секунд при 37 °C со встряхиванием 300 обор./мин. После трехкратной промывки ФСБТ, добавляют 50 мкл 1 мкг/мл меченного SULFO-TAG детекторного антитела, приготовленного в 1% (масс./об.) растворе блокатора А, и стандартный планшет MSD® и планшет инкубируют при 37 °C в течение 150 секунд при встряхивании 300 обор./мин. Планшет еще три раза промывают ФСБТ с последующим добавлением 150 мкл/лунка 1X буфера считывания (MSD®, кат. № R92TC-2). Стандартный планшет MSD® считывается с помощью прибора MESO Quickplex SQ 120/1300 (Meso Scale Discovery). Анализ данных выполняется с использованием GraphPad Prism 8 (версия 8.0.0 для Windows, GraphPad Software, Ла-Хойя, Калифорния, США, www.graphpad.com) и аффинность связывания (K_D) определяется с использованием интегрированной модели четырехпараметрической логистической кривой GraphPad Prism 8. Результаты представлены в Таблицах 2, 3 и 4.

Таблица 2: Аффинность связывания (K_D) комплексов антитело-IL-34 человека при 37°C

	Аффинность связывания, K_D (пМ, 37 °C, среднее значение $\pm$ STDEV, n = 5)
Антитело	Антиген (зрелый IL-34 человека)
Пример Антитела 1	59 $\pm$ 7
Пример Антитела 2	54 $\pm$ 7
Пример соединения D (hCSF1R-Fc)	56 $\pm$ 12

Таблица 3: Аффинность связывания (K_D) комплексов антитело-IL-34 яванской макаки при 37°C

	Аффинность связывания, K_D (пМ, 37 °C, среднее значение $\pm$ STDEV, n = 5)
Антитело	Антиген (IL-34 яванской макаки)
Пример Антитела 1	108 $\pm$ 25
Пример Антитела 2	152 $\pm$ 31

Таблица 4: Аффинность связывания (K_D) комплексов антитело-IL-34 мыши при 37°C

	Аффинность связывания, K_D (пМ, 37 °C)
Антитело	Антиген (IL-34 мыши)
Пример Антитела 3	16

IL-34 связывается с CSF1R человека с аффинностью приблизительно 50-100 пМ, из-за чего необходимо высокоаффинное антитело для эффективной нейтрализации этого цитокина в ЦНС. Считается, что блокирование IL-34 обеспечивает полезные средства для модификации заболевания, избегая при этом проблем безопасности, связанных с некоторыми существующими иммуномодулирующими способами лечения. Следовательно, нейтрализация IL-34-опосредованной передачи сигналов представляет собой терапевтический подход к лечению нейровоспаления, микроглиоза и нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и другие тауопатии и воспалительные заболевания.

Результаты в Таблицах 2, 3 и 4 демонстрируют, что антитела 1, 2 и 3 обладают высокой аффинностью к IL-34, и, в частности, Антитело 1 и Антитело 2 демонстрируют аффинность к IL-34 человека, сравнимую с hCSF1R-Fc. Следовательно, Антитела по данному изобретению обладают связывающими свойствами, которые позволяют им эффективно нейтрализовать IL-34 *in vivo*.

Физико-химические свойства:

Что касается свойств терапевтических продуктов антител, включая химическую стабильность, фотостабильность, 3-кратное медленное замораживание/оттаивание, растворимость, то Антитело 1 демонстрирует желаемое сочетание физико-химических свойств для использования в качестве терапевтического агента для человека.

Приготовление проб для анализа стабильности

Для приготовления образцов для анализа стабильности водный раствор антител подвергают диализу в течение ночи при 4 °C в ФСБ или 10 mM гистидина/280 mM маннита, уровень pH 6 (H6M), или 10 mM гистидина/150 mM NaCl, pH 6 (H6N), или 10 mM гистидин/17% сахароза, уровень pH 6,0 (H6S). При необходимости к окончательному образцу для анализа стабильности добавляют полисорбат-80 в количестве 0,05% («Т»). Приготовленное Антитело 1 дополнительно концентрируют до желаемой концентрации с использованием центрифужного концентратора Amicon.

Сокращения: 4 нед. = 4 недели; H6MT = 10 mM гистидина/280 mM маннита/0,05% полисорбата, pH 6,0; H6ST = 10 mM гистидина/17% сахарозы, 0,05% полисорбата, pH 6,0.

Химическая стабильность

Антитело 1 демонстрирует приемлемую оценку в течение четырех недель (4 нед.) проверки химической стабильности в горячих точках при концентрации 5 мг/мл в ФСБ. После четырех недель хранения при 35 °C в ФСБ и по сравнению с контрольным временем 0 Антитело 1 демонстрирует рост агрегатов 0,26%, что измеряется с помощью аналитической эксклюзионной хроматографии (аЭХ). Горячие точки проверяют картированием пептидов ЖХ-МС (жидкостная хроматография-масс-спектрометрия). Сообщается о следующих изменениях деградации/горячих точек в ФСБ при 35 °C по сравнению с образцом 4 нед./4 °C: изомеризация D104 (0,1%); расщепление G93/D94/S95 (0,8%). Общее изменение деградации CDR составило 0,9%.

Удержание температуры стабильности при высокой концентрации

Антитело 1 демонстрирует приемлемую оценку стабильности при высокой концентрации в течение 4 нед. при 100 мг/мл в Н6МТ. После 4 нед. хранения при 35 °С и по сравнению с контрольным временем 0 наблюдается рост агрегатов на 1,0 %, как измерено с помощью аЭХ, и увеличение на 0,9 % низкомолекулярных фрагментов в невосстанавливающих условиях, как определено с помощью CE-SDS (капиллярный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия). Горячие точки проверяют картированием пептидов ЖХ-МС. Сообщается о следующих изменениях деградации/горячих точек в Н6МТ после 4 нед. инкубации при 35 °С и по сравнению с контролем 4 нед. инкубации при 5 °С: дезамидирование Q91 (0,1%); изомеризация D104 (0,1%); расщепление G93/D94/S95 (0,5%). Общее изменение деградации CDR составило 0,7%.

Растворимость

Антитело 1 демонстрирует приемлемую оценку, основанную на оценке растворимости. Антитело достигает 150 мг/мл как в составах Н6М, так и в составах Н6Н без видимой преципитации или разделения фаз, исследованных после 3 дней хранения при 5°С с последующим хранением в течение одной недели при -5°С.

Фотостабильность

Антитело 1 демонстрирует приемлемую оценку для фотостабильности. Антитело в Н6МТ при концентрации 100 мг/мл подвергают воздействию УФ/видимого света (рекомендации ICH 20%) и сравнивают с контрольным образцом, который хранится в темноте. Химическую деградацию оценивают картированием пептидов ЖХ-МС. Общее изменение в анализе горячих точек CDR составило 0,1%. Рост расщепления наблюдался по остаткам G93/D94/S95 легкой цепи и составлял 0,1%. При воздействии УФ/видимого света рост агрегатов составил 3,6 %, как определено с помощью аЭХ.

Стабильность при медленном замораживании/оттаивании при высокой концентрации

Физическая стабильность Антитела 1 оценивается при медленном замораживании-оттаивании и демонстрирует приемлемую оценку при приготовлении в Н6СТ. После 3-кратных циклов медленного замораживания-оттаивания в лиофилизаторе с полками (VirTis, SP Scientific) Антитело 1 демонстрирует увеличение агрегатов на 0,1% в Н6СТ, определенное с помощью аЭХ, по сравнению с контролем времени 0.

Пример 3: Функциональная характеристика *in vitro* антител против IL-34 человека

Нейтрализация IL-34 *in vitro*

Антитела по данному изобретению исследовали на способность нейтрализовать связывание и/или активность IL-34. Нейтрализация связывания и/или активности IL-34 антителами по данному изобретению может быть оценена с помощью одного или более форматов анализа связывания рецептора IL-34/CSF1R, а также анализов активности IL-34 на основе клеток, например, как описано ниже.

Скрининг на наличие нейтрализующих антител, связывающих IL-34/CSF1R, может первоначально проводиться с помощью ферментативного анализа. В таких анализах можно использовать рекомбинантно экспрессированные белки внеклеточного домена CSF1R, способные связываться с IL-34. Эти белки могут быть связаны с планшетом для ИФА для захвата растворимого IL-34. Затем IL-34 можно обнаружить посредством либо биотинилирования антигена, либо путем обнаружения с помощью фермента с помощью фермента пероксидазы или фосфатазы, конъюгированной со стрептавидином/нейтравидином. В качестве альтернативного варианта можно использовать другой способ обнаружения, такой как антитело, которое детектирует His-меченую версию IL-34. Такие анализы нейтрализации включают предварительную инкубацию исследуемого антитела с меченым IL-34 (например, в течение 1 часа) перед добавлением в анализ связывания (а также контрольные образцы, в которых отсутствует антитело, нацеленное на IL-34). Можно использовать концентрации меченого IL-34, близкие к 50% уровню связывания (EC_{50}), а также различные концентрации (например, при оценке реакции на дозу антитела, такие как от около 100 микромолей до около 1 пикомоля). Ингибирование антител, оцениваемое в диапазоне, позволяет определить активность (IC_{50}).

Ингибирование IL-34-индуцированных ответов *in vitro*

Нейтрализацию активности IL-34 антителами по данному изобретению можно оценить с помощью одного или более анализов IL-34 на основе клеток, например, как описано ниже.

Способность антител по данному изобретению нейтрализовать активность репортерного гена люциферазы, индуцированную IL-34 человека, можно оценить в клетках NIH-3T3 hCSF1R AP1 или 293 hCSF1R SRE, трансфицированных кДНК для экспрессии CSF1R человека, CSF1R мыши или CSF1R яванской макаки (CSF1R человека (номер доступа: NP_001275634.1), CSF1R мыши (номер доступа: NM_001037859.2) и CSF1R яванской макаки (номер доступа: NC_022277)). (Термины «суно», «макака-крабоед» или «яванская

макака» используются в данном документе взаимозаменяемо.) Например, клетки 293/SRE, стабильно сверхэкспрессирующие CSF1R человека (hCSF1R), диссоциируют в 0,05% трипсин-ФСБ и высевают в количестве 70000 клеток на 100 мл в 96-луночных планшетах, обработанных культурой клеток ткани. На следующий день среду для выращивания удаляют и клетки помещают в условия голодания с помощью использования DMEM-F12 (модифицированная по Дульбекко среда Игла: питательная смесь F-12) с добавлением инактивированного нагреванием 1% ФБС (фетальной бычьей сыворотки). Через 24 часа после голодания клетки обрабатывают 100 нг/мл IL-34 человека или IL-34 яванской макаки и несколькими концентрациями либо hCSF1R-Fc, либо Антитела 1 в течение 6 часов. После инкубации клетки лизируют 50 мкл лизирующего буфера Promega™ Glo™ (Promega™ E266A) в течение 5 минут при легком встряхивании. Добавляют 50 мкл люминесцентного реагента BrightGlo™ (Promega™ E2620) и инкубируют лизированные клетки в течение 2 минут. Люминесценцию считывают на микропланшете-ридере Perkin Elmer Wallac 1420 Victor2™. Снижение относительных единиц флуоресценции (RFU), представленное в Таблице 5 и на Фигуре 1, отражает способность Антитела 1 нейтрализовать IL-34 и снижать активность люциферазы. Значение концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) для Антитела 1 составляет 385 пМ для нейтрализации hIL-34 (Фиг. 1) и 654 пМ для IL-34 яванской макаки. CSF1R-Fc человека используется в качестве положительного контроля в этом анализе и ингибирует активность люциферазы с IC₅₀ 560 пМ.

Таблица 5: Нейтрализация Антителом 1 активности репортерного гена люциферазы, индуцированной IL-34 человека, в клетках 293 SRE, экспрессирующих hCSF1R.

	hCSF1R-Fc		Антитело 1	
Концентрация [нМ]	Среднее значение RLU	Среднеквадратическое отклонение	Среднее значение RLU	Стандартное отклонение
133	1216	93,3	1180	18,4
26,6	995	153,4	1047,5	202,9
5,32	962	33,2	1117,5	38,9
1,064	2209	292,7	1494	70,7
0,213	7342,5	1282,0	7157,5	557,9
0,043	8472,5	727,6	7993	229,1
0,009	8185	459,6	8377,5	463,2
0,002	8253	365,6	8200,5	526,8
	IC ₅₀ [нМ]	95% ДИ [нМ]	IC ₅₀ [нМ]	95% ДИ [нМ]
	0,5598	от 0,4047 до 0,7743	0,3852	от 0,3364 до 0,4412

В Таблице 5 и на Фиг. 1 представлено, что Антитело 1 может эффективно нейтрализовать активность репортерного гена люциферазы, индуцированную IL-34 человека, в вышеприведенном анализе на основе клеток 293 hCSF1R (IC_{50} 0,3852 нМ) и демонстрировать активность по меньшей мере сравнимую или лучшую, чем активность hCSF1R-Fc в этом анализе. Эти данные подтверждают способность Антитела 1 нейтрализовать передачу сигналов, опосредованную IL-34 человека, и лечить заболевания, в этиопатогенез которых вносит вклад передача сигналов, опосредованная IL-34.

Способность Антитела 1 нейтрализовать димеризацию CSF1R в анализе димеризации PathHunter® eXpress:

Нейтрализацию IL-34 человека можно дополнительно оценить путем посева клеток U2OS CSF1R/CSF1R (анализ димеризации Path Hunter® eXpress Dimerization Assay, DiscoverX) в 96-луночные планшеты для оценки способности антител против IL-34 ингибировать димеризацию CSF1R. В этих анализах используется технология комплементации фрагментов фермента (EFC), в которой фермент b-галактозидаза (b-gal) расщепляется на два фрагмента: ProLink (PK) и акцептор фермента (EA). Сами по себе эти фрагменты не обладают b-gal-активностью; однако, когда они вынуждены комплементировать посредством белок-белковых взаимодействий, они образуют активный фермент b-gal. Анализ димеризации PathHunter® eXpress выявляет лиганд-индуцированную димеризацию двух субъединиц пары рецептор CSF1R-димер. Клетки были сконструированы для коэкспрессии одной субъединицы рецептора CSF1R, слитой с донором фермента (ED), и второго димерного партнера CSF1R, слитого с акцептором фермента (EA). Связывание IL-34 человека с одной субъединицей рецептора побуждает его взаимодействовать со своим димерным партнером, вызывая комплементацию двух фрагментов фермента. Это приводит к образованию функционального фермента, который гидролизует субстрат с образованием хемилюминесцентного сигнала. Уменьшение относительных единиц флуоресценции (RFU), представленное в Таблице 6 и/или на Фиг. 2, отражает способность Антитела 1 нейтрализовать IL-34 человека и снижать хемилюминесценцию. Значение концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) для Антитела 1 составило 226 пМ. CSF1R-Fc человека используют в качестве положительного контроля в этом анализе и ингибирует активность люциферазы с IC_{50} , равной 353 пМ. Данные в Таблице 6 и на Фиг. 2 подтверждают способность Антитела 1 блокировать взаимодействие IL-34 человека с CSF1R, тем самым ингибируя димеризацию CSF1R в этом анализе. Эти данные подтверждают возможность использования антител по данному изобретению для нейтрализации IL-34 человека.

Таблица 6: Способность Антитела 1 нейтрализовать димеризацию CSF1R в анализе димеризации PathHunter® eXpress.

hCSF1R-Fc			Антитело 1		
Конц. [нМ]	Среднее значени е RLU	Среднеквадратично е отклонение	Конц. [нМ]	Среднее значени е RLU	Среднеквадратично е отклонение
0,012	99405	5235,4	0,014	96495,5	3039,8
0,037	99090	1195,0	0,043	94760	1656,0
0,112	85642,5	832,3	0,128	81315,5	4488,0
0,335	68380	427,1	0,384	44394	91,9
1,004	40124	2375,9	1,151	29459,5	9280,7
3,011	29109	2643,2	3,453	27611,5	5296,9
9,033	26071,5	1119,4	10,360	28085,5	1103,8
27,100	34622,5	10704,9	31,080	27261	916,4
81,301	27529,5	3655,0	93,240	28438	1299,7
243,90			279,72		
2	32958	973,0	0	29827	319,6
IC50 [нМ]			IC50 [нМ]		
95% ДИ [нМ] от 0,2595 до 0,4629			95% ДИ [нМ] от 0,1936 до 0,2630		

Способность Антител против IL-34 ингибировать фосфорилирование ERK в клетках NIH-3T3/CSF1R.

В альтернативном варианте нейтрализацию IL-34 можно определить путем посева клеток NIH-3T3/CSF1R в 96-луночные планшеты для оценки способности антител против IL-34 ингибировать фосфорилирование киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK). В этом анализе клетки высевает на 1-й день в среду DMEM с добавлением 10% ФБС и инкубируют в течение ночи при 37 °С. На 2-й день среду удаляют, клетки промывают в безсывороточной среде DMEM и инкубируют в течение дополнительных 24 часов в безсывороточной среде DMEM. На третий день среду удаляют и к клеткам добавляют 1 мкг/мл IL-34 на 5 минут в присутствии или в отсутствие антитела против IL-34. Фосфо/Общую ERK1/2 оценивают с помощью набора для лизата цельных клеток (Meso Scale Discovery, кат. № K15107D-3). Снижение относительных единиц флуоресценции

(RLU), представленное в Таблице 7 и/или на Фиг. 3, отражает способность Антитела 3 нейтрализовать IL-34 и снижать хемилюминесценцию. Значение концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) для Антитела 3 составило 16 пМ. CSF1R-Fc человека использовали в качестве положительного контроля в этом анализе, и он ингибировал активность люциферазы с IC_{50} , равной 63 нМ.

Таблица 7: Способность Антитела 3 ингибировать фосфорилирование ERK в клетках NIH-3T3/CSF1R.

CSF1R			Антитело 3		
Конц. (нМ)	RLU	Среднеквадратичное отклонение	Конц. (нМ)	RLU	Среднеквадратичное отклонение
0	0,20982427	0,00490388	0	0,20982427	0,00490388
0,19	0,22678655	0,00463113	0,21	0,21266665	0,01065081
1	0,22612366	0,00094345	1,067	0,21877016	0,01222609
4,87	0,1696282	0,01027709	5,33	0,16963485	0,01577903
24,37	0,13803397	0,01444251	26,27	0,11909114	0,00324742
121,84	0,08925054	0,0052968	133,33	0,07254438	0,00527854
609,19	0,03167946	0,00344925	666,67	0,05997649	0,01118308
	IC_{50} (нМ) 63,2		IC_{50} (нМ)	15,7	

Способность антител против IL-34 ингибировать IL-34-индуцированную экспрессию CD163 в моноцитах человека, исследованная с помощью проточной цитометрии:

Нейтрализацию IL-34 также можно оценить путем измерения экспрессии антигена клеточной поверхности CD163 в моноцитах человека после воздействия IL-34 с помощью проточной цитометрии (см., например, Boulakirba, S., *et al. IL-34 and CSF-1 display an equivalent macrophage differentiation ability but a different polarization potential. Sci Rep* **8**, 256 (2018)). CD14-положительные моноциты обрабатывают IL-34 в течение 72 часов и оценивают экспрессию CD163 с помощью проточной цитометрии после окрашивания с использованием антител к CD163. В экспериментах, описанных на Фиг. 4, сдвиг числа клеток, экспрессирующих CD163, вправо указывает на то, что обработка IL-34 увеличивает экспрессию этого антигена в моноцитах. Увеличение экспрессии CD163 ингибируется добавлением Антитела 3. Антитело IgG4, соответствующего изотипа, используется в качестве отрицательного контроля в этом эксперименте.

Ингибирование Антителом 3 экспрессии CD163 в моноцитах человека в ответ на IL-34 демонстрирует способность антител по данному изобретению модулировать число моноцитов/макрофагов и/или фенотипическую дифференциацию в ответ на IL-34, и подтверждает возможность использования данных антител для лечения иммуноопосредованных заболеваний, таких как нейровоспаление и другие воспалительные состояния (см., например, Lelios, I. et al. *Emerging roles of IL-34 in health and disease*, J Exp Med (2020) 217 (3): e20190290).

Пример 4: Функциональная характеристика антител против IL-34 *in vivo*

Способность Антитела 3 снижать количество клеток микроглии в дорсальной коре и гиппокампе мышей

Способность антител против IL-34 по данному изобретению снижать количество клеток микроглии исследовали с использованием мышинной модели. Вкратце, самкам мышей FBV (Envigo, возраст 6-8 недель) вводят подкожно дозу 50 мг/кг Антитела 3 или контрольного антитела IgG соответствующего изотипа. В разное время после введения антитела (1, 3, 7 и 14 дней) животных подвергают эвтаназии с помощью CO₂, а мозг перфузируют физиологическим раствором. После перфузии мозговую ткань собирают, дорсальную кору и гиппокамп иссекают под микроскопом и мгновенно замораживают в жидком азоте. мРНК получают из дорсальной коры и гиппокампа и используют для оценки влияния лечения антителом против IL34 или контрольным антителом на экспрессию маркеров микроглии Iba-1 и CD11b с помощью TaqMan. Изменения экспрессии мРНК нормализованы по сравнению с внутренним контролем мРНК GAPDH и представлены как изменения кратности отличий. Экспрессия мРНК Iba-1 и CD11b обычно используется в качестве суррогатного маркера для количества клеток микроглии, и обычно считается, что снижение экспрессии этих маркеров отражает уменьшение микроглии головного мозга. Экспрессию мРНК двух рецепторов IL-34, CSF1R и PTP zeta, а также обоих лигандов CSF1R (IL-34 и CSF-1) также оценивают после введения Антитела 3. Результаты представлены в Таблице 8 (А-гиппокамп и В-кора головного мозга):

Таблица 8: Влияние Антитела 3 на экспрессию мРНК маркеров микроглии

8A Гиппокамп								
	1 День		3 Дня		7 Дней		14 Дней	
	Кратность отличий	SEM	Кратность отличий	SEM	Кратность отличий	SEM	Кратность отличий	SEM
Iba1	1,16	0,15	0,91	0,06	0,50	0,02	0,74	0,04

CD11b	0,85	0,06	0,49	0,03	0,74	0,03	0,64	0,04
CSF-1R	1,01	0,06	0,78	0,04	0,52	0,02	0,79	0,04
PTPRz	1,01	0,00	0,98	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
CSF-1	1,01	0,03	0,79	0,05	1,11	0,05	1,03	0,05
IL-34	1,01	0,00	0,99	0,00	0,99	0,00	0,98	0,00

8В Кора головного мозга

	1 День		3 Дня		7 Дней		14 Дней	
	Кратность отличий	SEM	Кратность отличий	SEM	Кратность отличий	SEM	Кратность отличий	SEM
Iba1	1,09	0,06	0,67	0,04	0,82	0,03	0,88	0,04
CD11b	0,99	0,08	0,69	0,05	0,59	0,02	0,70	0,06
CSF1R	0,97	0,02	0,59	0,03	0,79	0,02	0,80	0,03
PTPRz	1,01	0,00	0,98	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
CSF1	1,22	0,10	1,02	0,06	0,69	0,04	0,90	0,07
IL34	1,01	0,00	0,99	0,00	0,99	0,00	0,98	0,00

Способность Антитела 3 снижать количество клеток микроглии в мышинной модели болезни Альцгеймера (мышь Tg4510):

Способность антител против IL-34 по данному изобретению снижать количество клеток микроглии в мышинной модели болезни Альцгеймера (мышь Tg4510) также исследуют. Мышь Tg4510 представляет собой модель таупатии, характеризующуюся сверхэкспрессией мутантной формы P301L тау-белка человека в переднем мозге. Этих мышей используют для изучения образования нейрофибриллярных клубков в качестве модели болезни Альцгеймера, нейродегенеративных тауопатий и лобно-височной деменции, а также они демонстрируют прогрессирование невропатологии в зависимости от возраста и региона, связанное с когнитивными нарушениями. Вкратце, 8-недельным самкам мышей Tg4510 раз в две недели вводят дозы 5, 15 и 50 мг/кг антитела против IL-34 или соответствующего изотипа контрольного IgG в течение 9 последовательных недель. В конце периода дозирования животных подвергают эвтаназии и перфузии с помощью ФСБ. После перфузии ткань головного мозга собирают, и оба полушария отделяют через срединный сагиттальный разрез, и из каждого полушария иссекают под микроскопом и мгновенно замораживают в жидком азоте дорсальную кору и гиппокамп. Для оценки влияния антител против IL-34 на экспрессию маркеров микроглии мРНК получают из гиппокампа, а экспрессию CD11b, Iba-1 и CSF1R анализируют с помощью ПЦР в реальном времени, результаты представлены для гиппокампа в Таблице 9.

Таблица 9: Влияние Антитела 3 на экспрессию маркеров микроглии (мРНК из гиппокампа, CD11b, Iba-1 и CSF1R, проанализированные с помощью ПЦР в реальном времени)

	CD11b		Iba1		CSF1R	
	Кратность отличий	SEM	Кратность отличий	SEM	Кратность отличий	SEM
Контроль	1,00	0,03	1,00	0,07	1,00	0,07
Антитело 3, 5 мг/кг	0,87	0,02	0,89	0,04	0,76	0,03
Антитело 3, 15 мг/кг	0,61	0,02	0,78	0,03	0,63	0,03
Антитело 3, 50 мг/кг	0,36	0,01	0,65	0,02	0,45	0,02

Способность антител против IL34 уменьшать количество фосфорилированного тау-белка у мышей Tg4510:

Чтобы оценить, могут ли антитела против IL-34 снижать фосфо-Тау, одну из патологических форм Тау, ассоциированную с болезнью Альцгеймера, получают белковые лизаты из коры головного мозга животных, получавших антитело против IL-34 или контрольное антитело IgG. Вкратце, антитела против фосфо-тау (AT8) используют для покрытия лунок 96-луночного планшета и инкубируют в течение 24 часов при 4°C. На следующий день планшеты промывают 0,05% Твин/ФСБ, блокируют буфером SynBlock™ (ImmunoChemistry Technology) и инкубируют с лизатами коры головного мозга в течение 24 часов при 4 °C с последующим добавлением биотинилированного антитела для обнаружения тау (CP27) и конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена. Как представлено в Таблице 9, воздействие антителами против IL-34 снижало уровень фосфорилированного тау-белка в коре головного мозга мышей Tg4510.

Таблица 9: FDT248: Тау AT8 ИФА Р1 Кора головного мозга (мкг/мг белка)

	Контрольный mIgG1 50 мг/кг	Антитело 3, 50 мг/кг	Антитело 3, 15 мг/кг	Антитело 3, 5 мг/кг
Количество значений	18	17	18	18
Среднее значение	997,4	492,6	531,1	890,8
Среднеквадратическое отклонение	645,4	281,7	604,1	539,5

Стандартная ошибка среднего	152,1	68,3	142,4	127,2
процентное изменение по сравнению с контролем		-51%	-17%	-11%

Список аминокислотных и нуклеотидных последовательностей

Тяжелая цепь Антитела 1 (SEQ ID NO: 1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYATSWVRQAPGKGLEWVSAISHSGRSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSLDTWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEAAGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

Легкая цепь Антитела 1; LC Антитела 2 (SEQ ID NO: 2)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSISSAYLAWYQQKPGQAPRLLIYASSIRPTGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISP LEPEDFAVYYCSQYGDLSFSGGGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

HCVR Антитела 1 (SEQ ID NO: 3)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYATSWVRQAPGKGLEWVSAISHSGRSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSLDTWGQGTLVTVSS

LCVR Антитела 1; LCVR Антитела 2 (SEQ ID NO: 4)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSISSAYLAWYQQKPGQAPRLLIYASSIRPTGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISP LEPEDFAVYYCSQYGDLSFSGGGTKVEIK

HCDR1 Антитела 1 (SEQ ID NO: 5)

AASGFTFSSYATS

HCDR2 Антитела 1 (SEQ ID NO: 6)

AISHSGRSTYYADSVKG

HCDR3 Антитела 1 (SEQ ID NO: 7)

ARGRSSLD

LCDR1 Антитела 1 и Антитела 2 (SEQ ID NO: 8)

RASQSISSAYLA

LCDR2 Антитела 1 и Антитела 2 (SEQ ID NO: 9)

YASSIRPT

LCDR3 Антитела 1 и Антитела 2 (SEQ ID NO: 10)

SQYGDSL

ДНК, кодирующая тяжелую цепь Антитела 1 (SEQ ID NO: 11)

gaagttcaattgctggagtcagggggaggattggtccaacccggcgatcccttcggctgtcatgtgctgcttctggattaccttcttagct
acgctacctcctgggtaagacaggccccaggttaaggggctggagtggtgtcagcaataagtcactccggcgatctacatattatgctga
ttccgtcaaggacgtttactataagccgggataatagcaagaacactctgtatctgcaaatgaactctcttcgggcagaggacaccgctgt
ttactattgcgctcggggtcgaagctccctcgacacatgggggaggggtacattggtcaccgtatcctcagcctccaccaagggcccatcg
gtcttcccgtagcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccgctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccggtg
acggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggtgcacaccttcccggctgtcctacagtctcaggactctactccctcagcagcg
tggtgaccgtgcccctccagcagcttgggcacgaagacctacacgtgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaga
gttgagtcacaatatggtcccatgcccaccctgccagcacctgaggccgcccggggaccatcagcttctctgttcccccaaaaccca
aggacactctcatgatctcccgagccctgaggtcacgtgctggtggtggacgtgagccaggaagaccccaggtccagttcaactggt
acgtggatggcgtggaggtgcataatccaagacaagccgcccggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtctcacc
gtcctgcaccaggactggtgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaggcctcccgtctccatcgagaaaaccatctcc
aaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
tgctggtcaaaaggttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggaaagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgctcc
cgtgctggactccgacggctcttctctctacagcaggttaaccgtggacaagagcaggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctcc
gtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacagaagagcctctcctgtctctgggt

ДНК, кодирующая легкую цепь Антитела 1 (SEQ ID NO: 12)

gaaatcgtagtaccctaaagcccaggactttgagttgtcccctggggaaagagcaaccctctcatgtcgtgcaagtcaaagtatatccag
tgcatatctgcttggtatcagcaaaagcctggtcaagcaccaggtgcttattatgctcatctattagacctacaggtatccctgaccgatt
ctccgggaagtggcagtggtgactgatttcacacttacaatttccccctggaacctgaagactttgccgtatattattgttcacagtatggcgact
cacttagtttcggggggcgccacaaaggttgaataaagcggactgtggtgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttga
aatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatccagagaggccaaagtacagtggaaaggtggataacgccctccaatcgg
gtaactcccaggagagtgctacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaagcagacta
cgagaaacacaaagtctacgctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccgctacaaagagcttcaacaggggagagtgctc

Тяжелая цепь Антитела 2 (SEQ ID NO: 13)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFSYAHSWVRQAPGKGLEWVSAISHSGRSTY
YADAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSLDTWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEAAGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

HCVR Антитела 2 (SEQ ID NO: 14)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFSYAHSWVRQAPGKGLEWVSAISHSGRSTY
YADAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSLDTWGQGTLVTVSS

HCDR1 Антитела 2 (SEQ ID NO: 15)

AASGFTFFSYAHS

HCDR2 Антитела 2 (SEQ ID NO: 16)

AISHSGRSTYYADAVKG

HCDR3 Антитела 2 (SEQ ID NO: 17)

ARGRSSLDLT

ДНК, кодирующая тяжелую цепь Антитела 2 (SEQ ID NO: 18)

gaagttcaattgctggagtcagggggaggattgggtccaacccggcgatcccttcggctgtcatgtgctgcttctggattaccttcttcagct
acgctcattctcgggtaagacaggccccaggttaaggggctggagtgggtgtcagcaataagtcactccgggcgatctacatattatgctgat
gctgtcaaaggacgctttactataagccgggataatagcaagaacactctgtatctgcaaatgaactcttctgggcagaggacaccgctggt
tactattgcgctcggggctgaagctccctcgacacatgggggcagggtacattgggtaccgtatcctcagcctccaccaagggcccatcgg
tctcccgctagcgccctgtccaggagcacctccgagagcacagccgctgggctgctgtgtaaggactactccccgaaccggtga
cgggtgctgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgctgcacacctcccggtgtcctacagtccctcaggactctactccctcagcagcgt
gggtaccgtgccctccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaga
gttgagtccaatatgtgtcccatgccaccctgccagcacctgaggccgcccggggaccatcagttctctgttcccccaaaacca
aggacactctcatgatctcccgaccctgaggtcacgtgctggtgggtggacgtgagccaggaagaccccgaggtccagtcaactggt
acgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcccggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctacc
gtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccgctcctccatcgagaaaaccatctcc
aaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacc
tgctgtgcaaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggaaagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcctcc
cgtgctggactccgacggctcttctctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctcc
gtgatgatgaggctctgcacaaccactacacagaagagcctctcctgtctctgggt

Тяжелая цепь Антитела 3 (SEQ ID NO: 19)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISHRGGST
LYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSLDGWGQGTMTVTS
SAKTTTPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQ
SDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNV AHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI
FPPKPKDVL TITLTPK VTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRS
VSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSA AFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKD
KVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLN VQKSNWEA
GNTFTCSVLHEGLHNHHT EKSLSHSPGK

Легкая цепь Антитела 3 (SEQ ID NO: 20)

EIVLTQSPGILSLSPGERASLSCRASTSVSSAYLAWYQQKPGQAPRLLIYASSHRPLGIPDR
FSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYGDSL SFGGGTKVEIKRADAAPT VSIFFPSSE
QLTSGGASVVCFLNNFY PKDINVKWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLTL
TKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

HCVR Антитела 3 (SEQ ID NO: 21)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISHRGGST
LYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSLDGWGQGTMTVTS
SAKTTTPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQ
SDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNV AHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI
FPPKPKDVL TITLTPK VTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRS
VSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSA AFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKD

KVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEA
GNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK

LCVR Антитела 3 (SEQ ID NO:22)

EIVLTQSPGILSLSPGERASLSCRASTSVSSAYLAWYQQKPGQAPRLLIYASSHRPLGIPDR
FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGDSL SFGGGTKVEIKRADAAPTVSIFPPSSE
QLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLT
TKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

HCDR1 Антитела 3 (SEQ ID NO: 23)

AASGFTFSYYAMS

HCDR2 Антитела 3 (SEQ ID NO: 24)

AISHRGGSTLYADSVKG

HCDR3 Антитела 3 (SEQ ID NO: 25)

ARGRSSLDG

LCDR1 Антитела 3 (SEQ ID NO: 26)

RASTSVSSAYLA

LCDR2 Антитела 3 (SEQ ID NO: 27)

YASSHRPL

LCDR3 Антитела 3 (SEQ ID NO: 28)

QQYGDSL

ДНК, кодирующая тяжелую цепь антитела 3 (SEQ ID NO: 29)

gaagtccaactcttgagagcgggtggaggtctggtcagcctggcggtcactgcggcttagctgtgccgctagtggcttcactttcagttatt
atgccatgtcctgggtacgccaggccccaggcaagggtctggaatgggtgtctgccatttcccacaggggcggctcaacattgtacgctga
cagtgtaaaaggacggtttactataagcagggataactcaaaaaacacattgtatctccagatgaactccttcgggcagaagacaccgctgt
gtattattgtctcgggtcgtcctcctcgatggctgggggcaaggaacctggtcactgtaagctccgcaaaacgacacccccatctg
tctatccgctcgcacctggatctgccgcccagaccaacagcatggtgacctgggctgtctggtgaagggtacttccctgagcctgtgaca
gtgacctggaacagcggctctctgtctagcggcgtgcacacattccctgccgtgtgcagagcgacctgtacacctgagcagcagcgtg
accgtgcctagcagcacatggcctagcgagaccgtgacatgcaactggcccaccctgcctcttctaccaaggtggacaagaagatcgtg
cccagagactgcggctgcaagccttgcatctgcaccgtgcctgaggtgagcagcgtgttcattctcccacccaagcccaaggacgtgtca
ccatcacctcaccccaaggtcacgtgtgtgtgtagacatcagcaaggatgatcccaggtccagttcagctggtttgtagatgatgtg
agggtcacacagctcagacgcaaccccgaggagcagttcaacagcactttccgctcagtcagtgaaactcccatcatgcaccaggact
ggctcaatggcaaggagttcaaatgcagggtcaacagtgcagctttccctgccccatcgagaaaacctctccaaaaccaaggcagac
cgaagggtccacaggtgtacaccattccacctcccaaggagcagatggccaaggataaagtcagtcgtgacctgcatgataacagacttctt
cctgaagacattactgtggagtggcagtggaatgggcagccagcggagaactacaagaacactcagcccatcatggacacagatggctct

tacttcgtctacagcaagctcaatgtgcagaagagcaactgggaggcaggaaatactttcacctgctctgtgttacatgagggcctgcacaa
ccaccatactgagaagagcctctcccactctcctggtaaatagtatttaaagagtttaa

ДНК, кодирующая легкую цепь Антитела 3 (SEQ ID NO: 30)

gagatagtagtaccctaaagtccgggtatattgtccctcagccctggcgaacgagccagccttagctgtcgggcctccaccagtgtgtcaa
gcgcgtacttggcctgggtaccaacaaaaaccaggccaagcgccctcgactcctgatatatgcctcctcccaccggccccttggatcccgga
cagattttccgggtcaggctcaggtacagattttaccctcactatatcccgactggagcccaggacttcgcagtatattactgccagcagtat
ggtgactccctctcctttggcgggggtactaaggttgaaatcaagcgggctgatgcggcgccactgtatccatctcccaccatccagtga
gcagttaacatctggaggtgctagcgtcgtgtgcttctgaacaactctaccccaaagacatcaatgtcaagtggagattgatggcagtga
acgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaaagacagcacctacagcatgagcagcacccctcacgttgaccaagg
acgagtatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttcaccattgtcaagagcttcaacaggaatgagtg

IL-34 человека (SEQ ID NO: 41)

NEPLEMWPLTQNEECTVTGFLRDKLQYRSRLQYMKHYFPINYKISVPYEGVFRIANVTR
LQRAQVSERELRYLWVLVSLSATESVQDVLLEGHPWKYLQEVETLLLNVQQGLTDVE
VSPKVESVLSLLNAPGPNLKLVRPKALLDNCFRVMELLYCSCCKQSSVLNWQDCEVPSP
QSCSPEPSLQYAATQLYPPPPWSPSSPPHSTGSVRPVRAQGEGLLP

IL-34 мыши (SEQ ID NO: 42)

NENLEIWTLTQDKECDLTGYLRGKLQYKNRLQYMKHYFPINYRIA VPYEGVLRVANITR
LQKAHVSERELRYLWVLVSLNATESVMDVLLEGHPWKYLQEVQTLLENVQRSMDV
EIGPHVEAVLSLLSTPGLSLKLVRPKALLDNCFRVMELLYCSCCKQSPILKWQDCELPRL
HPHSPGSLMQCTATNVYPLSRQTPTSLPGSPSSSHGSLP

Шарнирная область IgG4PAA (SEQ ID NO: 51)

ESKYGPPCPPCP

Fc-область IgG4PAA (SEQ ID NO: 52)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывает IL-34 человека, при этом указанное антитело содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), причем указанная VH содержит области, определяющие комплементарность тяжелой цепи (HCDR) - HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и указанная VL содержит области, определяющие комплементарность легкой цепи (LCDR) - LCDR1, LCDR2 и LCDR3, при этом

указанная HCDR1 содержит SEQ ID NO: 5,
указанная HCDR2 содержит SEQ ID NO: 6,
указанная HCDR3 содержит SEQ ID NO: 7,
указанная LCDR1 содержит SEQ ID NO: 8,
указанная LCDR2 содержит SEQ ID NO: 9, и
указанная LCDR3 содержит SEQ ID NO: 10.

2. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что указанная VH содержит SEQ ID NO: 3 и указанная VL содержит SEQ ID NO: 4.

3. Антитело по пп. 1 или 2, отличающееся тем, что указанное антитело содержит тяжелую цепь (HC), содержащую SEQ ID NO: 1, и легкую цепь (LC), содержащую SEQ ID NO: 2.

4. Антитело, которое связывает IL-34 человека, содержащее VH и VL, при этом указанная VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и указанная VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, причем

указанная HCDR1 содержит SEQ ID NO: 15,
указанная HCDR2 содержит SEQ ID NO: 16,
указанная HCDR3 содержит SEQ ID NO: 17,
указанная LCDR1 содержит SEQ ID NO: 8,
указанная LCDR2 содержит SEQ ID NO: 9, и
указанная LCDR3 содержит SEQ ID NO: 10.

5. Антитело по п. 4, отличающееся тем, что указанная VH содержит SEQ ID NO: 14 и указанная VL содержит SEQ ID NO: 4.

6. Антитело по пп. 4 или 5, отличающееся тем, что указанное антитело содержит HC, содержащую SEQ ID NO: 13, и LC, содержащую SEQ ID NO: 2.

7. Антитело, которое связывает IL-34 мыши, при этом указанное антитело содержит VH и VL, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, и указанная VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, при этом

указанная HCDR1 содержит SEQ ID NO: 23,
указанная HCDR2 содержит SEQ ID NO: 24,
указанная HCDR3 содержит SEQ ID NO: 25,
указанная LCDR1 содержит SEQ ID NO: 26,
указанная LCDR2 содержит SEQ ID NO: 27, и
указанная LCDR3 содержит SEQ ID NO: 28.

8. Антитело по п. 7, отличающееся тем, что указанная VH содержит SEQ ID NO: 21 и указанная VL содержит SEQ ID NO: 22.

9. Антитело по пп. 7 или 8, отличающееся тем, что указанное антитело содержит HC, содержащую SEQ ID NO: 19, и LC, содержащую SEQ ID NO: 20.

10. Нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую SEQ ID NO, выбранную из одной или более из группы, состоящей из: 11, 12, 18, 29 и 30.

11. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 10.

12. Вектор по п. 11, отличающийся тем, что указанный вектор содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность SEQ ID NO: 11 или 18, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 12.

13. Вектор по п. 11, отличающийся тем, что указанный вектор содержит первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 29, и вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 30.

14. Композиция, содержащая первый вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 11 или 18, и второй вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 12.

15. Композиция, содержащая первый вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 29, и второй вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 30.

16. Клетка, содержащая вектор по пп. 12 или 13.

17. Клетка, содержащая первый вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 11 или 18, и второй вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 12.

18. Клетка, содержащая первый вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 29, и второй вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SEQ ID NO: 30.

19. Клетка по любому из пп. 16-18, отличающаяся тем, что указанная клетка представляет собой клетку млекопитающего.

20. Способ получения антитела, включающий культивирование клетки по любому из пп. 16-19 в условиях, обеспечивающих экспрессию указанного антитела, и выделение указанного экспрессированного антитела из культуральной среды.

21. Антитело, полученное способом по п. 20.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-9 или 21, и фармацевтически приемлемый эксципиент, разбавитель или носитель.

23. Способ лечения иммуноопосредованного заболевания у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп. 1-9 или 21 или фармацевтической композиции по п. 22.

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что иммуноопосредованное заболевание выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера; таупатии; синдрома Шегрена (СШ); ревматоидного артрита (РА); воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), atopического

дерматита, заболевания почек, сепсиса и/или неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП).

25. Способ по п. 23, отличающийся тем, что иммуноопосредованное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера.

26. Антитело по любому из пп. 1-9 или 21 для применения в терапии.

27. Антитело по любому из пп. 1-9 или 21 или фармацевтическая композиция по п. 22 для лечения иммуноопосредованного заболевания.

28. Антитело или фармацевтическая композиция по п. 27, отличающиеся тем, что иммуноопосредованное заболевание выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера; таупатии; синдрома Шегрена (СШ); ревматоидного артрита (РА); воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), atopического дерматита, заболевания почек, сепсиса и/или неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП).

29. Антитело или фармацевтическая композиция по п. 27, отличающиеся тем, что иммуноопосредованное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера.

30. Применение антитела по любому из пп. 1-9 или 21 в изготовлении лекарственного средства для лечения иммуноопосредованного заболевания.

31. Применение по п. 30, отличающееся тем, что иммуноопосредованное заболевание выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера; таупатии; синдрома Шегрена (СШ); ревматоидного артрита (РА); воспалительного заболевания кишечника (ВЗК), atopического дерматита, заболевания почек, сепсиса и/или неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП).

32. Применение по п. 30, отличающееся тем, что иммуноопосредованное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера.

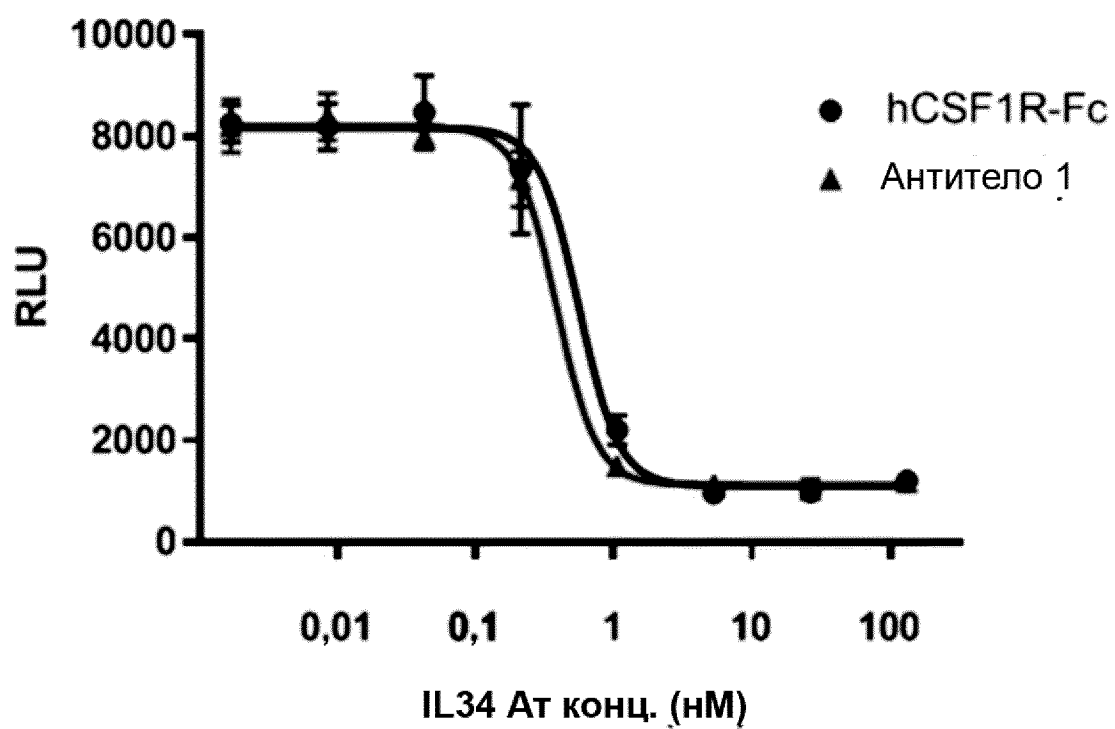
33. Способ определения уровня IL-34 человека в биологической жидкости, включающий:

- (а) контактирование биологической жидкости с диагностическим моноклональным антителом против IL-34 человека или его

антигенсвязывающим фрагментом, которые специфически связываются с IL-34 человека, и содержат аминокислотную последовательность, как в SEQ ID NO: 41, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащими: области, определяющие комплементарность, легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 8), (SEQ ID NO: 9) и (SEQ ID NO: 10), соответственно, и области, определяющие комплементарность, тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 15), (SEQ ID NO: 16) и (SEQ ID NO: 17), соответственно;

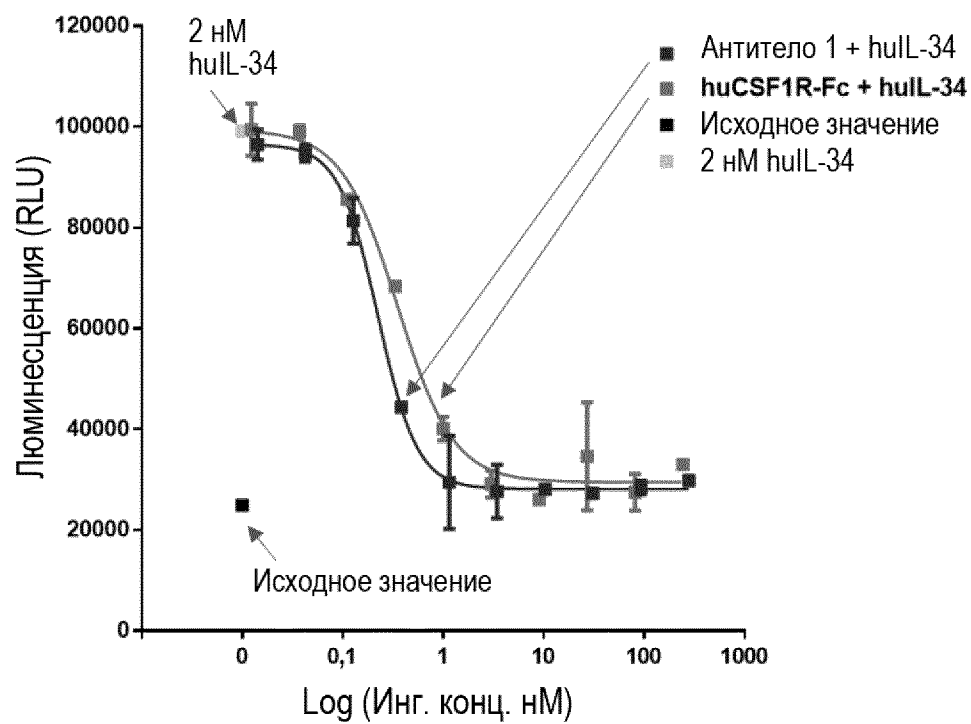
- (b) необязательно удаление любого неспецифически связанного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и
- (c) детектирование и/или количественная оценка количества моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которые специфически связаны с IL-34 человека.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что указанная биологическая жидкость представляет собой кровь, сыворотку или плазму или спинномозговую жидкость, и указанное контактирование происходит *ex vivo*.

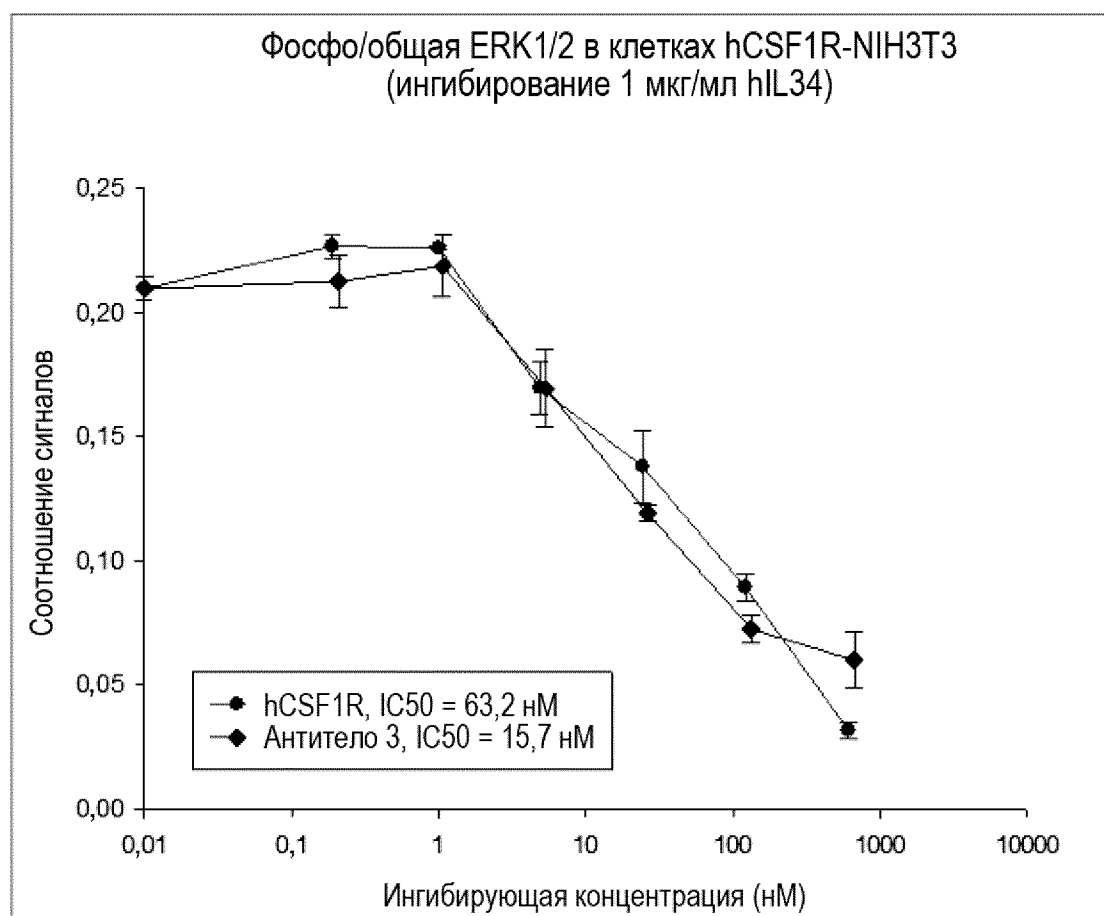


Фиг. 1

Антитело 1 и huCSF1R-Fc по сравнению с hIL-34 в анализе димеризации CSF1R



Фиг. 2



Фиг. 3

4/4

ФИГ. 4

