(19)патентное ведомство

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

- Дата публикации заявки (43) 2023.11.30
- (22) Дата подачи заявки 2018.05.04

- (51) Int. Cl. *C07K 16/00* (2006.01) A61K 39/39 (2006.01) **A61P 27/00** (2006.01)
- СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (54)
- 62/502,479 (31)
- (32) 2017.05.05
- (33) US
- (62)201992626; 2018.05.04
- **(71)** Заявитель:

АЛЛАКОС ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Беббингтон Кристофер Роберт, Янгблад Брэдфорд Эндрю, Томасевич Ненад (US)

202391816

- Представитель: Медведев В.Н. (RU)
- Настоящее изобретение относится к способам лечения аллергического заболевания глаз (57) (например, аллергического конъюнктивита, кератоконъюнктивита или гигантского папиллярного конъюнктивита). В частности, настоящее изобретение относится к способам лечения аллергического заболевания глаз путем введения антител, которые связываются с человеческим сиглеком-8, или композиций, содержащих указанные антитела. Настоящее изобретение также относится к изделиям или наборам, содержащим антитела, которые связываются с человеческим сиглеком-8, применяемым для лечения.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578749EA/032

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ГЛАЗ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По данной заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/502479, поданной 5 мая 2017 года, раскрытие которой включено в настоящее описание во всей своей полноте в качестве ссылки.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ В ТЕКСТОВОМ ФАЙЛЕ ASCII

[0002] Содержание следующего представления в текстовом файле ASCII полностью включено в настоящее описание в виде ссылки: машиночитаемая форма (CRF) списка последовательностей (имя файла 701712000740SEQLIST.TXT:, дата записи: 3 мая 2018 года, размер: 115 КБ).

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0003] Настоящее изобретение относится к способам лечения аллергического заболевания глаз (например, аллергического конъюнктивита, кератоконъюнктивита или гигантского папиллярного конъюнктивита) путем введения антител, которые связываются с человеческим сиглеком-8, и композиций, содержащих указанные антитела.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Аллергические заболевания глаз входят в число наиболее распространенных заболеваний глаз. В течение последних десятилетий количество людей с аллергическими заболеваниями глаз возросло, и предполагается, что в настоящее время этими заболеваниями страдают по меньшей мере 15-20% населения (La Rosa, M. *et al.* (2013) *Ital. J. Pediatr.* 39:18). Симптомы варьируют по степени тяжести: от раздражения, покраснения и отека конъюнктивы до катаракты и потери зрения.

[0005] Аллергические заболевания глаз охватывают ряд специфических клинических образований с различными механизмами действия. Предполагается, что задействованы механизмы, опосредованные IgE и не опосредованные IgE, а также многочисленные цитокины, хемокины и сигнальные пути (La Rosa, M, etal. (2013) Ital. J. Pediatr. 39:18). При некоторых формах аллергического заболевания глаз, таких как атопический кератоконъюнктивит (Morgan, S J. etal. (1991) Eye 5:729-735), который может привести к развитию катаракты и потере зрения, наблюдается гиперплазия тучных клеток и наличие эозинофилов.

[0006] Сохраняется потребность в новых терапевтических подходах, которые направлены на лечение воспаления, лежащего в основе аллергических заболеваний глаз.

[0007] Все ссылки, цитируемые в настоящем описании, включая заявки на патенты, публикации патентов и научную литературу, включены в настоящее описание во всей их полноте в виде ссылки, как если бы каждая отдельная ссылка была специально и отдельно указана как включенная в качестве ссылки.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] Для удовлетворения этой и других потребностей в настоящем изобретении предлагаются, помимо прочего, способы лечения или профилактики аллергического заболевания глаз (например, аллергического конъюнктивита, кератоконъюнктивита или гигантского папиллярного конъюнктивита) путем введения антител, которые связываются с человеческим сиглеком-8, и/или композиций, содержащих указанные антитела.

[0009] Соответственно, некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам лечения или профилактики аллергического заболевания глаз у индивидуума, включающим введение индивидууму эффективного количества антитела, которое связывается с человеческим сиглеком-8.

[0010] Другие аспекты настоящего изобретения относятся к способам лечения или профилактики аллергического заболевания глаз у индивидуума, включающим введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8.

[0011] В некоторых вариантах осуществления индивидуум страдает аллергическим конъюнктивитом. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума сезонный аллергический конъюнктивит. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума круглогодичный аллергический конъюнктивит. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума атопический кератоконъюнктивит. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума весенний кератоконъюнктивит. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума гигантский папиллярный конъюнктивит. В некоторых вариантах осуществления индивидуум использует контактные линзы. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет увеличенное воспаление по меньшей мере в части конъюнктивы по сравнению с индивидуумом без аллергического заболевания глаз. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет увеличенное количество тучных клеток, нейтрофилов, эозинофилов и/или лимфоцитов по меньшей мере в части конъюнктивы по сравнению с индивидуумом без аллергического заболевания глаз. В некоторых вариантах осуществления соскоб с конъюнктивы, полученный индивидуума, содержит эозинофилы. В некоторых вариантах осуществления образец сыворотки или образец слезы, полученный от индивидуума, имеет повышенный уровень IgE по сравнению с индивидуумом без аллергического заболевания глаз. В некоторых вариантах осуществления аппликационный накожный или внутрикожный тест на выполняемый путем введения индивидууму аллергена, аллергию, аллергической реакции. В некоторых вариантах осуществления один или более симптомов у индивидуума снижены по сравнению с исходным уровнем до введения композиции или антитела. В некоторых вариантах осуществления одно или более из следующего: зуда конъюнктивы, покраснения конъюнктивы, отека конъюнктивы, выделения из глаз, изъязвления, слезотечения, гипертрофии век, коркообразования, симблефарона, периокулярной экземы, мадароза, фотофобии, кератита, гигантских папиллом и катаракты у индивидуума, уменьшается по сравнению с исходным уровнем до

введения композиции или антитела. В некоторых вариантах осуществления композицию или антитело вводят путем внутривенной инфузии. В некоторых вариантах осуществления композицию или антитело вводят подкожной инъекцией.

[0012] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящей заявке (см., например, выше), антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит (i), HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и/или причем вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66. В некоторых вариантах осуществления антитело область тяжелой цепи, содержащую содержит вариабельную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16 или 21. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит Fc-область тяжелой цепи, содержащую Fc-область человеческого IgG. В некоторых вариантах осуществления Fcобласть человеческого IgG содержит человеческий IgG1. В некоторых вариантах осуществления Fc-область человеческого IgG содержит человеческий IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 76 или 77. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 67-70; и/или причем вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11-14; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23-24. В некоторых вариантах осуществления антитело вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2-14; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16-24. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область

тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2-10; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16-22. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: (1) HC-FR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 26-29; (2) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; (3) HC-FR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 31-36; (4) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEO ID NO: 62; (5) HC-FR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 38-43; (6) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и (7) HC-FR4, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 45-46, и/или (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую: (1) LC-FR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 48-49; (2) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; (3) LC-FR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 51-53; (4) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65; (5) LC-FR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 55-58; (6) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; и (7) LC-FR4, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: (а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: (1) HC-FR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (2) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; (3) HC-FR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; (4) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; (5) HC-FR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; (6) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и (7) HC-FR4, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45; и/или (b) содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую: (1) LC-FR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 48; (2) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; (3) LC-FR2, аминокислотную содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51; (4) HVR-L2, содержащую NO: 65; (5) LC-FR3, аминокислотную последовательность SEQ ID содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55; (6) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; и (7) LC-FR4, содержащую последовательность SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах аминокислотную осуществления антитело содержит: (а) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: (1) HC-FR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26; (2) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; (3) HC-FR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; (4) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; (5) HC-FR3,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; (6) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и (7) HC-FR4, 45; и/или содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: вариабельную область содержащую: (1) LC-FR1, содержащую легкой цепи, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48; (2) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; (3) LC-FR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 51; (4) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEO ID NO: 65; (5) LC-FR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; (6) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; и (7) LC-FR4, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (і) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91 и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; и/или вариабельную легкой цепи, содержащую (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100 и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103; вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92 и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101 и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104; или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93 и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96; и/или вариабельную область цепи, (i) HVR-L1, легкой содержащую содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102 и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 109; вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 110; или вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108; и/или вариабельную

область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В некоторых вариантах осуществления антитело разработано для улучшения активности антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). В некоторых вариантах осуществления антитело содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc-области, которая улучшает активность ADCC. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела являются нефукозилированными. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитела, выбранный из группы, состоящей из фрагментов Fab, Fab'-SH, Fv, scFv и (Fab')2.

[0013] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящей заявке (см., например, выше), антитело содержит Fc-область и N-гликозид-связанные углеводные цепи, связанные с Fc-областью, причем менее 50% N-гликозид-связанных углеводных цепей антитела в композиции содержат остаток фукозы. В некоторых вариантах осуществления практически ни одна из N-гликозид-связанных углеводных цепей антитела в композиции не содержит остатка фукозы. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с человеческим сиглеком-8 и сиглеком-8 примата, не являющегося человеком. В некоторых вариантах осуществления примат, не являющийся человеком, представляет собой павиана. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом в домене 1 человеческого сиглека-8, причем домен 1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом в домене 3 человеческого сиглека-8, причем домен 3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело 4F11. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом в домене 2 или домене 3 человеческого сиглека-8. В некоторых вариантах осуществления домен 2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело 1С3. В некоторых вариантах осуществления домен 3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело 1Н10. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом в домене 1 человеческого сиглека-8 и конкурирует с антителом 4F11 за связывание с сиглеком-8. В некоторых вариантах осуществления антитело не конкурирует с антителом 2Е2 за связывание с сиглеком-8. В некоторых вариантах осуществления антитело не является антителом 2Е2. В некоторых вариантах осуществления домен 1 содержит аминокислотную последовательность: 112. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит Fc-область тяжелой цепи, содержащую Fc-область человеческого IgG. В некоторых вариантах осуществления Fcобласть человеческого IgG содержит Fc-область человеческого IgG1. В некоторых вариантах осуществления Fc-область человеческого IgG1 является нефукозилированной. В некоторых вариантах осуществления Fc-область человеческого IgG содержит Fc-область человеческого IgG4. В некоторых вариантах осуществления Fc-область человеческого IgG4 содержит аминокислотную замену S228P, причем аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, как у Кабат. В некоторых вариантах осуществления антитело приводит к истощению эозинофилов в крови и/или ингибирует активацию тучных клеток.

[0014] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящей заявке (см., например, выше), композицию или антитело вводят в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами для лечения или профилактики аллергического заболевания глаз. В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных терапевтических агентов выбирают из группы, состоящей из кортикостероида, антигистамина, кетотифена, азеластина, эпинастина, бепостатина, циклоспорина и нестероидного противовоспалительного средства (НПВС, NSAID).

[0015] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящей заявке (см., например, выше), индивидуум представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления антитело находится в фармацевтической композиции, содержащей антитело и фармацевтически приемлемый носитель.

[0016] Другие аспекты настоящего изобретения относятся к изделию, содержащему лекарственное средство, содержащее композицию, содержащую антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8, и вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению лекарственного средства нуждающемуся в этом индивидууму в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления.

[0017] Следует иметь в виду, что одно, некоторые или все свойства различных вариантов осуществления, описанные в настоящем описании, могут быть объединены с образованием других вариантов осуществления настоящего изобретения. Эти и другие аспекты настоящего изобретения станут очевидными для специалиста в данной области техники. Эти и другие варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно описаны путем подробного описания, которое следует ниже.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Определения

[0018] Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными композициями или биологическими системами, которые, безусловно, могут меняться. Также следует понимать, что используемая в настоящей заявке терминология предназначена исключительно для описания конкретных вариантов осуществления изобретения и не должна рассматривается как ограничивающая. В настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают также множественное число, если из контекста в явном виде не следует иное. Таким образом, например, ссылка на «молекулу» необязательно включает комбинацию двух или более

таких молекул и т.п.

[0019] Используемый в настоящем описании термин «примерно» относится к обычному диапазону ошибок для соответствующего значения, который специалист в данной области техники легко определит. При указании «примерно» значение или параметр в настоящем описании включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на это значение или параметр как таковые.

[0020] Понятно, что аспекты и варианты осуществления изобретения включают «содержащий», «состоящий» и «состоящий по существу из» аспектов и вариантов осуществления.

[0021] Термин «антитело» включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (включая полноразмерные антитела, которые имеют **Fc-область** иммуноглобулина), композиции антител С полиэпитопной специфичностью, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела, одноцепочечные молекулы), а также фрагменты антител (например, Fab, F(ab')₂ и Fv). Термин «иммуноглобулин» (Ig) используется в настоящем описании взаимозаменяемо с «антителом».

[0022] Основная единица 4-цепочечного антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. Антитело IgM состоит из 5 основных гетеротетрамерных звеньев вместе с дополнительным полипептидом, называемым Ј-цепью, и содержит 10 антигенсвязывающих участков, тогда как IgA-антитела содержат от 2 до 5 основных 4цепочечных звеньев, которые могут полимеризоваться с образованием поливалентных комплексов в комбинации с J-цепью. В случае IgG 4-цепочечная единица обычно составляет примерно 150000 дальтон. Каждая L-цепь связана с Н-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две Н-цепи связаны друг с другом одной или более дисульфидными связями в зависимости от изотипа Н-цепи. Каждая из Н- и Lцепей имеют регулярно расположенные межцепочечные дисульфидные мостики. Каждая Н-цепь имеет на N-конце вариабельный домен (V_H), за которым следуют три константных домена (Сн) для каждой из α и γ цепей и четыре домена Сн для и изотипов μ и ε. Каждая L-цепь имеет на N-конце вариабельный домен (V_L), за которым следует константный домен, расположенный на другом конце. VL выровнен с VH, а CL выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи (Сн1). Определенные аминокислотные остатки, как полагают, образуют стык между вариабельными доменами легкой цепи и тяжелой цепи. Пара V_H и V_L вместе образует один антигенсвязывающий участок. Структуру и свойства различных классов антител см., например, в Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parsolw (eds), Appieton & Lange, Norwaik, CT, 1994, page 71 and Chapter 6.

[0023] L-цепь любого из вида позвоночных может быть отнесена к одному из двух четко различимых типов, названных каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. Иммуноглобулины могут быть отнесены к

разным классам или изотипам в зависимости от аминокислотной последовательности цепей (C_H) . константного домена ИХ тяжелых Существует ПЯТЬ иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, тяжелые цепи которых обозначаются как α, δ, ε, γ и μ, соответственно. Классы γ и α дополнительно делятся на подклассы на основе относительно незначительных различий в последовательности и функции Сн, например, у человека экспрессируются следующие подклассы: IgG1, lgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Антитела IgG1 могут существовать в многочисленных полиморфных вариантах, называемых аллотипами (рассмотренные в Jefferis and Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4, 1-7), любой из которых является подходящим для использования в настоящем изобретении. Распространенными аллотипными вариантами в популяциях людей являются аллотипы, обозначенные буквами a, f, n, z.

[0024]«Выделенное» антитело представляет собой антитело, идентифицировано, отделено и/или извлечено из компонента среды его продуцирования (например, в естественном виде или рекомбинантном). В некоторых вариантах осуществления выделенный полипептид не связан со всеми другими компонентами среды его продуцирования. Загрязняющие компоненты среды продуцирования, такие как компоненты, происходящие ИЗ рекомбинантных трансфицированных представляют собой материалы, которые обычно мешают исследованию, диагностике или терапевтическому использованию антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В некоторых вариантах осуществления полипептид очищают: (1) до более 95 мас.% антитела, согласно оценке измерения, например, методом Лоури, и в некоторых вариантах осуществления до более 99 мас.%; (1) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков Nтерминальной или внутренней аминокислотной последовательности с помощью секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности согласно оценке с помощью SDS-PAGE в нередуцирующих или редуцирующих условиях с окраской кумасси синим или серебром. Выделенное антитело включает антитело in situ в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент естественной среды антитела не будет присутствовать. Однако обычно выделенный полипептид или антитело получают после по меньшей мере одной стадии очистки.

[0025] Используемый в настоящем описании термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций и/или пост-трансляционных модификаций (например, изомеризации, амидирования), которые могут присутствовать в незначительных количествах. В некоторых вариантах осуществления в моноклональных антителах происходит отщепление С-конца тяжелой цепи и/или легкой цепи. Например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков отщепляются от С-конца тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления при отщеплении С-конца происходит удаление С-концевого лизина из тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления в

моноклональных антителах происходит отщепление N-конца тяжелой цепи и/или легкой цепи. Например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков отщепляются от N-конца тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления моноклональные антитела являются высокоспецифичными и направлены на один антигенный участок. В некоторых осуществления вариантах моноклональные антитела являются высокоспецифичными и направлены на несколько антигенных участков (такие как биспецифическое или полиспецифическое антитело). антитело Модификатор «моноклональный» указывает на характер антитела, получаемого из, по существу, гомогенной популяции антител, и его не следует толковать как требующий получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены различными способами, включая, например, метод гибридомы, методы рекомбинантной ДНК, методы фагового дисплея и методы продуцирования животными человеческих или человекоподобных антител, которые имеют части или все локусы человеческого иммуноглобулина или гены, кодирующие последовательности человеческого иммуноглобулина.

[0026] Термин «голое антитело» относится к антителу, которое не конъюгировано с цитотоксическим фрагментом или радиоактивной меткой.

[0027] Термины «полноразмерное антитело», «интактное антитело» или «цельное антитело» используются взаимозаменяемо для обозначения антитела в его по существу интактной форме, в отличие от фрагмента антитела. В частности, цельные антитела включают антитела с тяжелыми и легкими цепями, включая Fc-область. Константные домены могут представлять собой константные домены с нативной последовательностью (например, константные домены с человеческой нативной последовательностью) или варианты их аминокислотной последовательности. В некоторых случаях интактное антитело может иметь одну или более эффекторных функций.

[0028] «Фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, антигенсвязывающую и/или вариабельную область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', $F(ab')_2$ и Fv; дитела; линейные антитела (см. патент США № 5641870, пример 2; *Zapata et al, Protein Eng.* 8(10):1057-1062 [1995]); молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0029] Расщепление антител папаином приводит к образованию двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, называемых фрагментами «Fab», и оставшемуся фрагменту «Fc», обозначение которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Fab-фрагмент состоит из полной L-цепи вместе с доменом вариабельной области H-цепи (V_H) и первым константным доменом одной тяжелой цепи (C_H1). Каждый Fab-фрагмент является одновалентным в отношении связывания антигена, т.е. имеет один антигенсвязывающий участок. Обработка антитела пепсином дает один большой фрагмент F(ab')₂, который соответствует примерно двум Fab-фрагментам,

связанным дисульфидными связями, имеющим различные антигенсвязывающие активности, и все еще способные к перекрестному связыванию антигена. Fab'-фрагменты отличаются от Fab-фрагментов наличием нескольких дополнительных остатков на карбоксильном конце домена C_H1, включая один или более цистеинов из шарнирной области антитела. Fab'-SH в настоящем описании означает Fab', в котором остаток(и) цистеина в константных доменах несут свободную тиольную группу. F(ab')₂ фрагменты антитела изначально получают в виде пар Fab' фрагментов с цистеинами шарнирной области между ними. Также известны другие химические сочетания фрагментов антител.

[0030] Fc-фрагмент содержит карбоксильные концевые участки обеих H-цепей, которые удерживаются вместе дисульфидными связями. Эффекторные функции антител определяются последовательностями в Fc-области, областью, которая также распознается Fc-рецепторами (FcR), находящимися на клетках определенных типов.

[0031] «Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный антигенраспознающий и антигенсвязывающий участок. Этот фрагмент состоит из димера одного домена вариабельной области тяжелой и одного домена вариабельной области легкой цепи, которые находятся в тесной нековалентной ассоциации. В результате укладки ЭТИХ двух доменов образуются гипервариабельных петель (по 3 петли в каждой из цепей H и L), которые предоставляют аминокислотные остатки для связывания антигена наделяют антитело антигенсвязывающей специфичностью. Однако даже один вариабельный домен (или половина Fv, содержащего только три антиген-специфические HVR) обладает способностью распознавать и связывать антиген, хотя и с более низким сродством, чем полный связывающий участок.

[0032] «Одноцепочечный Fv», также сокращенно обозначаемый как «sFv» или «scFv», представляет собой фрагмент антитела, который содержит домены VH и VL антитела, связанные в одну полипептидную цепи. В некоторых вариантах осуществления полипептид sFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами V_H и V_L , который позволяет sFv формировать нужную структуру для связывания антигена. Для обзора sFv, см. Pluckthim in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

[0033] «Функциональные фрагменты» антител по настоящему изобретению содержат часть интактного антитела, обычно включающую антигенсвязывающую или вариабельную область интактного антитела или Fv-область антитела, которая сохраняет или имеет модифицированную способность связывать FcR. Примеры фрагментов антител включают молекулы линейного антитела, одноцепочечного антитела и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[0034] Моноклональные антитела по изобретению включают, в частности, «химерные» антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретного вида или принадлежащих конкретному классу или подклассу

антител, тогда остальная часть цепи(ей) идентична или как соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител, при условии, что они проявляют нужную биологическую активность (патент CIIIA № 4816567; Morrison etal, Proc. Nail. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Представляющие интерес химерные антитела по изобретению включают антитела PRIMATIZED®, в которых антигенсвязывающий участок антитела происходит из антитела, полученного, например, путем иммунизации макак представляющим интерес антигеном. Используемый в настоящем описании термин «гуманизированное антитело» используется в качестве подгруппы «химерных антител».

[0035] «Гуманизированные» формы нечеловеческих (например, мышиных) антител собой химерные которые содержат представляют антитела, минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления гуманизированное антитело представляет собой человеческий иммуноглобулин (реципиентное антитело), в котором остатки из HVR реципиента заменены остатками из HVR не относящегося к человеку вида (донорское антитело), такого как мышь, крыса, кролик или не относящийся к человеку примат, с нужной специфичностью, сродством и/или способностью. В некоторых случаях FR остатки человеческого иммуноглобулина заменяют соответствующими остатками, относящимися к человеческим. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые отсутствуют в реципиентном антителе или в донорском антителе. Эти модификации могут быть сделаны для дальнейшего улучшения характеристик антител, таких как сродство связывания. Как правило, гуманизированное антитело обычно содержит, по существу, все из по меньшей мере одного, и обычно двух вариабельных доменов, в которых все или, по существу, все гипервариабельные петли соответствуют петлям последовательности иммуноглобулина, отличающегося от человеческого, и все или, по существу, все FR-области представляют собой области из последовательности человеческого иммуноглобулина, хотя FR-области могут включать одну или более отдельные замены остатков в FR, которые улучшают характеристики антител, такие как сродство связывания, изомеризация, иммуногенность и т.д. В некоторых вариантах осуществления количество этих аминокислотных замен в FR составляет не более 6 в Hцепи и не более 3 в L-цепи. Гуманизированное антитело также необязательно содержит по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, обычно области человеческого иммуноглобулина. Для получения дополнительной информации см., например, Jones ei al, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al, Nature 332:323-329 (1988); и Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). См., например, также, Vaswam and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994); и патенты США №№ 6982321 и 7087409. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела направлены на один антигенный участок. В некоторых

вариантах осуществления гуманизированные антитела направлены на несколько антигенных участков. Альтернативный способ гуманизации описан в патенте США № 7981143 и публикации заявки на патент США № 2006/0134098.

[0036] «Вариабельная область» или «вариабельный домен» антитела относится к аминоконцевым доменам тяжелой или легкой цепи антитела. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи обычно обозначают как «VH» и «VL», соответственно. Эти домены обычно являются наиболее вариабельными частями антитела (относительно других антител того же класса) и содержат антигенсвязывающие участки.

[0037] Термин «гипервариабельная область», «НVR» или «НV» в контексте настоящего изобретения относится к областям вариабельного домена антитела, которые являются гипервариабельными в последовательности и/или образуют петли определенной структуры. Обычно антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). В нативных антителах Н3 и L3 демонстрируют наибольшее разнообразие из шести HVR, и, в частности, считается, что Н3 играет уникальную роль в придании антителам уникальной специфичности. См., например, Xu et al. Immunity 13:37-45 (2000); Johnson and Wit, Methods в Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)). Действительно, встречающиеся в природе антитела верблюдов, состоящие только из тяжелой цепи, являются функциональными и стабильными несмотря на отсутствие легкой цепи. См., например, Наmers-Casterman el al, Nature 363:446-448 (1993) и Sheriff et al., Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996).

[0038] Используется несколько определений HVR, которые включены в настоящее описание. HVR, которые являются определяющими комплементарность областями (CDR) по Кабат, основаны на вариабельности последовательности и являются наиболее часто используемыми (Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^{IX} Ed. Public Health Sendee, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). При этом, HVR по Чотиа относятся к расположению структурных петель (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987). «Контактные» HVR основаны на анализе доступных сложных кристаллических структур. Остатки каждого из этих HVR указаны ниже.

Петля	Кабат	Чотиа	Контакт
L1	L24-L34	L26-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H32	Н30-Н35В (нумерация по Кабат)
H1	H31-H35	H26-H32	Н30-Н35 (нумерация по Чотиа)
H2	H50-H65	H53-H56	H47-H58
Н3	H95-H102	H95-H102	H93-H101

[0039] Если не указано иное, остатки вариабельного домена (остатки HVR и остатки каркасного участка) пронумерованы в соответствии с Kabat et al., см. выше.

[0040] Остатки «каркасного» или «FR» участка представляют собой остатки

вариабельного домена, отличные от остатков HVR, как определено в настоящем описании.

[0041] Выражение «нумерация остатков вариабельного домена по Кабат» или «нумерация положений аминокислот по Кабат» и их варианты, относится к системе нумерации, используемой для вариабельных доменов тяжелой цепи или вариабельных доменов легкой цепи сборки антител согласно Kabat et al., см. выше. При применении этой системы нумерации, фактическая линейная аминокислотная последовательность может включать меньше или дополнительные аминокислоты, соответствующие удалению или вставке в FR или HVR вариабельного домена. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может включать одну аминокислотную вставку (остаток 52а по Кабат) после остатка 52 Н2 и встроенные остатки (например, остатки 82а, 82b и 82с и т.д. по Кабат) после остатка 82 в FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Кабат может быть антитела путем выравнивания областей гомологии заданного последовательности антитела относительно «стандартной» последовательности, пронумерованной по Кабат.

[0042] «Человеческий акцепторный каркасный участок», в контексте настоящего изобретения, представляет собой каркасный участок, содержащий аминокислотную последовательность каркасного участка VL или VH, полученного из каркасного участка человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусного каркасного участка. Человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусного каркасного участка человеческого иммуноглобулина или человеческого консенсусного каркасного участка, может содержать такую же аминокислотную последовательность или может содержать ранее существовавшие замены в аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления количество ранее существовавших замен в аминокислотной последовательности составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее

[0043] «Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности», относительно эталонной полипептидной последовательности определяется в виде процента аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и при необходимости введения зазоров (гэпов) для достижения максимального процента идентичности последовательностей, без учета любых консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть достигнуто различными способами, которые находятся в пределах компетенции специалиста уровня техники, например с помощью доступных компьютерных программ, таких как BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей.

Например, % идентичности аминокислотной последовательности заданной аминокислотной последовательности A относительно, с или по сравнению с заданной аминокислотной последовательностью B (или говоря иным способом, заданная аминокислотная последовательность A имеет или содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности относительно, с или по сравнению с заданной аминокислотной последовательностью B) рассчитывается следующим образом:

100 x доля X/Y

где X представляет собой количество аминокислотных остатков, оцененных как идентичные совпадения последовательностей при выравнивании A и B с помощью программы, и где Y представляет собой общее количество аминокислотных остатков в В. Понятно, что если длина аминокислотной последовательности A не равна длине аминокислотной последовательности B, % идентичности аминокислотной последовательности A с B не будет равен % идентичности аминокислотной последовательности B с A.

[0044] Антитело, которое «связывается», «специфически связывается» или является «специфическим к» конкретному полипептиду или эпитопу на конкретном полипептиде, представляет собой антитело, которое связывается с этим конкретным полипептидом или эпитопом на конкретном полипептиде и при этом практически не связывается с любым другим полипептидом или эпитопом на этом полипептиде. В некоторых вариантах осуществления связывание описанного в настоящей заявке антитела к сиглеку-8 (например, антитела, которое связывается с человеческим сиглеком-8) с неродственным полипептидом, не относящимся к сиглеку-8, составляет менее чем примерно 10% от связывания антитела с сиглеком-8, измеренного способами, известными в данной области (например, иммуноферментным анализом (ELISA)). В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с сиглеком-8 (например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8), имеет константу диссоциации (Kd) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ, ≤ 0.7 нМ, ≤ 0.6 нМ, ≤ 0.5 нМ, ≤ 0.1 нМ, ≤ 0.01 нМ или ≤ 0.001 нМ (например, $\leq 10^{-18}$ м или менее, например, от $\leq 10^{-19}$ м до $\leq 10^{-13}$ м), например, от $\leq 10^{-19}$ м до $\leq 10^{-13}$ м),

[0045] Термин «антитело к сиглеку-8» или «антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8» относится к антителу, которое связывается с полипептидом или эпитопом человеческого сиглека-8, при этом не демонстрируя существенного связывания с любым другим полипептидом или эпитопом неродственного полипептида, не являющегося сиглеком-8.

[0046] Используемый в настоящем описании термин «сиглек-8» относится к человеческому белку сиглек-8. Термин также включает встречающиеся в природе варианты сиглека-8, включая варианты сплайсинга или аллельные варианты. Аминокислотная последовательность типичного человеческого сиглека-8 показана в SEQ ID NO: 72. Аминокислотная последовательность другого типичного человеческого сиглека-8 показана в SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления человеческий

белок сиглек-8 содержит внеклеточный домен человеческого сиглека-8, слитого с Fсобластью иммуноглобулина. Аминокислотная последовательность приведенного в качестве примера внеклеточного домена человеческого сиглека-8, слитого с Fсобластью иммуноглобулина, показана в SEQ ID NO: 74. Аминокислотная последовательность, подчеркнутая в SEQ ID NO: 74, означает аминокислотную последовательность слитого белка Fс-сиглек-8.

Аминокислотная последовательность человеческого сиглека-8
GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDRPYQDAPVATN
NPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGSMKWSYKSQLN
YKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHSRNLTCSVPWACKQGTPPMISWIGASVSSPG
PTTARSSVLTLTPKPQDHGTSLTCQVTLPGTGVTTTSTVRLDVSYPPWNLTMTVFQGDA
TASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELPRVH
VRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFLSFC
IIFIIVRSCRKKSARPAAGVGDTGMEDAKAIRGSASQGPLTESWKDGNPLKKPPPAVAPS
SGEEGELHYATLSFHKVKPQDPQGQEATDSEYSEIKIHKRETAETQACLRNHNPSSKEV
RG (SEQ ID NO:72)

AMUHOKUCJOTHAS ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СИГЛЕКА-8
GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDRPYQDAPVATN
NPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGSMKWSYKSQLN
YKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHPRNLTCSVPWACKQGTPPMISWIGASVSSPG
PTTARSSVLTLTPKPQDHGTSLTCQVTLPGTGVTTTSTVRLDVSYPPWNLTMTVFQGDA
TASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELPRVH
VRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFLSFC
IIFIIVRSCRKKSARPAAGVGDTGMEDAKAIRGSASQGPLTESWKDGNPLKKPPPAVAPS
SGEEGELHYATLSFHKVKPQDPQGQEATDSEYSEIKIHKRETAETQACLRNHNPSSKEV
RG (SEQ ID NO:73)

Аминокислотная последовательность слитого белка Fc-сиглек-8

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDRPYQDAPVATN
NPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGSMKWSYKSQLN
YKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHSRNLTCSVPWACKQGTPPMISWIGASVSSPG
PTTARSSVLTLTPKPQDHGTSLTCQVTLPGTGVTTTSTVRLDVSYPPWNLTMTVFQGDA
TASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELPRVH
VRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGIEGRSDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:74)

[0047] Антитела, которые «индуцируют апоптоз» или являются «апоптотическими», представляют собой которые антитела, индуцируют запрограммированную гибель клеток, определенную стандартным анализом апоптоза, таким как связывание аннексина V, фрагментацию ДНК, уменьшение размера клеток, дилатацию эндоплазматического ретикулума, фрагментацию клеток и/или образование мембранных везикул (называемых апоптотическими телами). Например, апоптотическая активность антител к сиглеку-8 (например, антитела, которое связывается с человеческим сиглеком-8) по настоящему изобретению может быть продемонстрирована путем окрашивания клеток аннексином V.

[0048] «Эффекторные функции» антитела относятся к видам биологической активности, свойственных Fc-области (Fc-области с нативной последовательностью или вариантной Fc-области аминокислотной последовательности) антитела, и изменяются в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антител включают: связывание C1q и комплемент-зависимую цитотоксичность; связывание с Fc-рецептором; антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; подавление рецепторов клеточной поверхности (например, рецепторов В-клеток); и активацию В-клеток.

[0049] «Антителозависимая клеточная цитотоксичность» или «ADCC» относится к форме цитотоксичности, при которой секретированный Ід связывается с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, клетках естественных киллерах (NK), нейтрофилах И макрофагах), позволяя цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с несущей антиген клеткой-мишенью и впоследствии убивать эту клетку-мишень с помощью цитотоксинов. Антитела "приводят в действие", цитотоксические клетки, необходимые для уничтожения клетки-мишени, с помощью этого механизма. Основные опосредующие ADCC клетки, NK-клетки, экспрессируют только FcyRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcyRI, FcyRII и FcyRIII. Экспрессия Fc на гемопоэтических клетках суммирована в таблице 3 на странице 464 y Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991). В некоторых

вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 (например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8), описанное в настоящей заявке, усиливает АДСС. Для оценки активности ADCC представляющей интерес молекулы может быть выполнен анализ ADCC *in vitro*, такой как описано в патенте США № 5500362 или 5821337. Пригодные эффекторные клетки таких анализов включают мононуклеарные для периферической крови (PBMC) и естественные киллеры (NK). Альтернативно или дополнительно, АДСС активность представляющей интерес молекулы может быть оценена in vivo, например, на животной модели, такой как раскрыто у Clynes et al., PNAS USA 95:652-656 (1998). Другие варианты Fc, которые изменяют ADCC активность и другие свойства антител, включают варианты, описанные у Ghetie et al., Nat Biotech, 15:637-40, 1997; Duncan et al., Nature 332:563-564, 1988; Lund et al., J. Immunol. 147:2657-2662, 1991; Lund et al., Mol Immunol. 29:53-59, 1992; Alegre et al., Transplantation 57:1537-1543, 1994; Hutchins et al., Proc Natl, Acad Sci USA 92:11980-11984, 1995; Jefferis et al., Immunol Lett. 44:111-117, 1995; Lund et al., FASEB J9:115-119, 1995; Jefferis et al., Immunol Lett 54:101-104, 1996; Lund et al., J. Immunol. 157:4963-4969, 1996; Armor et al., Eur. J. Immunol. 29:2613-2624, 1999; Idusogie et al., J. Immunol. 164:4178-4184, 200; Reddy et al., J. Immunol. 164:1925-1933, 2000; Xu et al., Cell Immunol 200:16-26, 2000; Idusogie et al., J. Immunol. 166:2571-2575, 2001; Shields et al., J Biol Chem 276:6591-6604, 2001; Jefferis et al., Immunol Lett 82:57-65, 2002; Presta et al., Biochem Soc Trans 30:487-490, 2002; Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005-4010, 2006; патентах США №№ 5624821; 5885573; 5677425; 6165745; 6277375; 5869046; 6121022; 5624821; 5648260; 6194551; 6737056; 6821505; 6277375; 7335742 и 7317091.

[0050] Термин «Fc-область» в контексте настоящего изобретения используется для определения С-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая Fc-области нативной последовательности и вариантные Fc-области. Хотя границы Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина могут меняться, Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG обычно определяют как отрезок от остатка аминокислоты в положении Cys226 или Pro230 до ее карбоксильного конца. Fc-области нативной последовательности, подходящие для использования в антителах по настоящему изобретению, включают человеческие IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Для устранения гетерогенности, наблюдаемой у рекомбинантного антитела IgG4, может быть введена замена одной аминокислоты (S228P по нумерации Кабат; обозначенная IgG4Pro). См. Angal, S. et al., (1993) Mol Immunol. 30, 105-108.

[0051] «Нефукозилированное» или «фукоза-дефицитное» антитело относится к варианту гликозилированного антитела, содержащему Fc-область, в котором углеводная структура, присоединенная к Fc-области, имеет сниженный уровень фукозы или не содержит фукозу. В некоторых вариантах осуществления антитело со сниженным уровнем фукозы или без фукозы имеет улучшенную функцию ADCC. Нефукозилированные или фукоза-дефицитные антитела имеют сниженный уровень фукозы относительно количества фукозы в том же антителе, продуцированном в

клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления композиция нефукозилированного или фукоза-дефицитного антитела в контексте настоящего изобретения представляет собой композицию, в которой менее чем примерно 50% N-связанных гликанов, прикрепленных к Fc-области антител в композиции, содержат фукозу.

[0052] Термины «фукозилирование» или «фукозилированный» относятся к наличию остатков фукозы в олигосахаридах, присоединенных к пептидному остову антитела. В частности, фукозилированное антитело содержит α(1,6)-связанную фукозу во внутреннем остатке N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) в одном или обоих из N-связанных олигосахаридах, присоединенных к Fc-области антитела, например, в положении Asn297 Fc-домена человеческого IgG1 (EU нумерация остатков Fc-области). Asn297 также может быть расположен на примерно +3 аминокислоты выше или ниже от положения 297, т.е. между положениями 294 и 300, из-за незначительных изменений в последовательностях иммуноглобулинов.

[0053] «Степень фукозилирования» представляет собой процент фукозилированных олигосахаридов относительно всех олигосахаридов, идентифицированных способами, известными в данной области, например, в композиции N-гликозидазой F, измеренный времяпролетной обработанных спектрометрией с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS). В композиции "полностью фукозилированного антитела" по существу все олигосахариды содержат остатки фукозы, т.е. являются фукозилированными. В некоторых вариантах осуществления композиция полностью фукозилированного антитела имеет степень фукозилирования, по меньшей мере, примерно 90%. Соответственно, отдельное антитело в такой композиции обычно содержит остатки фукозы в каждом из двух Nсвязанных олигосахаридов в Fc-области. И наоборот, в композиции «полностью нефукозилированного» антитела практически ни один из олигосахаридов не является фукозилированным, и отдельное антитело в такой композиции не содержит остатков фукозы ни в одном из двух N-связанных олигосахаридов в Fc-области. В некоторых вариантах осуществления композиция полностью нефукозилированного антитела имеет степень фукозилирования менее чем примерно 10%. В композиции «частично фукозилированного антитела» только часть олигосахаридов содержит фукозу. Отдельное антитело в такой композиции может не содержать остатки фукозы ни в одном, содержать остатки фукозы в одном или в обоих N-связанных олигосахаридах в Fc-области, при условии, что такая композиция по существу не содержит ни одного отдельного антитела, у которого отсутствуют остатки фукозы в N-связанных олигосахаридах в Fc-области, или по существу не содержит ни одного отдельного антитела, которое содержит остатки фукозы в обоих N-связанных олигосахаридах в Fс-области. В одном из вариантов осуществления композиция частично фукозилированного антитела имеет степень фукозилирования от примерно 10% до примерно 80% (например, от примерно 50% до примерно 80%, от примерно 60% до примерно 80% или от примерно 70% до примерно

80%).

[0053] Термин «сродство связывания» в контексте настоящего изобретения относится к силе нековалентных взаимодействий между одним связывающим участком молекулы (например, антителом) и его партнером по связыванию (например, антигеном). В некоторых вариантах осуществления сродство связывания антитела с сиглеком-8 (который может представлять собой димер, такой как слитый белок сиглек-8-Fc, описанный в настоящей заявке) как правило может быть представлено константой диссоциации (Kd). Сродство может быть измерено общепринятыми способами, известными в данной области техники, в том числе описанными в настоящей заявке.

[0055] Термин «авидность связывания» в контексте настоящего изобретения относится к силе связывания нескольких участков связывания молекулы (например, антитела) с ее партнером по связыванию (например, антигеном).

[0056] «Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитела по изобретению, представляет собой нуклеиновой которая молекулу кислоты, идентифицирована и отделена по меньшей мере от одной загрязняющей молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в среде, в которой была продуцирована. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота не связана ни с одним из компонентов, ассоциированных со средой продуцирования. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полипептиды и антитела, в контексте настоящего изобретения находятся в форме, отличной от той формы или окружающей среды, в которой они встречаются в природе. Поэтому выделенные молекулы нуклеиновой кислоты отличаются от нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды и антитела по изобретению, присутствующие в клетках в естественных условиях.

[0057] Термин «фармацевтический состав» относится к препарату, находящемуся в такой форме, которая обеспечивает биологическую активность активного ингредиента, и не содержащему дополнительные компоненты, которые являются неприемлемо токсичными для индивидуума, которому вводится этот состав. Такие составы являются стерильными.

[0058] Термин «носители» в контексте настоящего изобретения включает фармацевтически приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы, которые являются нетоксичными для клетки или млекопитающего, подвергающегося воздействию этих веществ в используемых дозировках и концентрациях. Часто физиологически приемлемый носитель представляет собой водный рН-буферный раствор. Примеры физиологически приемлемых носителей включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярный (менее чем примерно 10 остатков) полипептид; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу,

маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как $TWEEN^{TM}$, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и $PLURONICS^{TM}$.

[0059] Используемый в настоящем описании термин «лечение» относится к клиническому вмешательству, предназначенному для изменения естественного развития индивидуума или клетки, подвергаемой лечению при наличии клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают снижение скорости прогрессирования заболевания, облегчение или смягчение болезненного состояния, и ремиссию или улучшение прогноза. «Лечение» индивидуума является успешным, например в случае смягчения или устранения одного или более симптомов, связанных с заболеванием (например, аллергическим заболеванием глаз). Например, «лечение» индивидуума является успешным, если оно приводит к повышению качества жизни человека, страдающего от заболевания, уменьшению дозы других лекарств, необходимых для лечения заболевания, уменьшению частоты рецидивов заболевания, уменьшению тяжести заболевания, задержке развития или прогрессирования заболевания и/или повышению выживания индивидуума.

[0060] Используемый в настоящем описании термин «в сочетании с» или «в комбинации с» относится к назначению одного способа лечения в дополнение к другому способу лечения. Как таковое, «в сочетании с» или «в комбинации с» относится к получению индивидуумом одного способа лечения до, во время или после получения другого способа лечения.

[0061] Используемый в настоящем описании термин «профилактика» или «предотвращение» включает профилактику возникновения или рецидива заболевания у индивидуума. Индивидуум, который еще не диагностирован как имеющий заболевание, может иметь предрасположенность к развитию этого заболевания, быть чувствительным к заболеванию или подверженным риску развития заболевания. В некоторых вариантах осуществления антитела к сиглеку-8 (например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8), описанные в настоящей заявке, используются для задержки развития заболевания (например, аллергического заболевания глаз).

[0062] В контексте настоящего изобретения, индивидуум, «подверженный риску» развития заболевания (например, аллергического заболевания глаз), может иметь или не иметь детектируемое заболевание или симптомы заболевания и может иметь или не иметь детектируемое заболевание или симптомы заболевания до применения описанных в настоящей заявке методов лечения. «В группе риска» означает, что индивидуум имеет один или более факторов риска, которые являются измеримыми параметрами, коррелирующими с развитием заболевания (например, аллергического заболевания глаз), известными в данной области. Индивидуум, имеющий один или более из этих факторов риска, имеет более высокую вероятность развития заболевания, чем индивидуум, не имеющий одного или более этих факторов риска.

[0063] Термин «эффективное количество» относится по меньшей мере к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения нужного или указанного эффекта, включая терапевтический или профилактический результат. Эффективное количество может быть введено за одно или более введений. «Терапевтически эффективное количество» представляет собой по меньшей мере минимальную концентрацию, требуемую для достижения ощутимого улучшения при лечении конкретного заболевания. Терапевтически эффективное количество в контексте настоящего изобретения может варьировать в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и вес пациента и способность антитела вызывать нужный ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также может быть таким, при котором терапевтически полезные эффекты антитела перевешивают любые токсические или вредные эффекты. «Профилактически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата. Поскольку профилактическую дозу вводят индивидууму до развития заболевания или на более ранней стадии заболевания, то, как правило, но не обязательно, профилактически эффективное количество может быть меньше терапевтически эффективного количества.

[0064] «Хроническое» введение относится к введению лекарственного средства(средств) в непрерывном, в отличие от острого режима, с целью поддержания первоначального терапевтического эффекта (активности) в течение продолжительного периода времени. «Прерывистое» введение относится к лечению, которое не предполагает постоянного режима введения без перерыва, и скорее является циклическим.

[0065] Термин «вкладыш в упаковку» относится к инструкциям, обычно вкладываемые в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию относительно показаний, способов применения, дозировки, введения, комбинированной терапии, противопоказаний и/или предупреждений, касающихся применения таких терапевтических продуктов.

[0066] Используемый в настоящем описании термин «индивидуум» или «субъект» представляет собой млекопитающее. «Млекопитающее» для целей лечения включает людей, домашних и сельскохозяйственных животных, и животных, содержащихся в зоопарках, используемых в спортивных состязаниях, или домашних питомцев, таких как собаки, лошади, кролики, крупный рогатый скот, свиньи, хомяки, песчанки, мыши, хорьки, крысы, кошки и т.д. В некоторых вариантах осуществления индивидуум или субъект представляет собой человека.

II. Способы

[0067] Настоящее изобретение относится к способам лечения и/или профилактики аллергического заболевания глаз (например, аллергического конъюнктивита, кератоконъюнктивита или гигантского папиллярного конъюнктивита) у индивидуума, включающим введение индивидууму эффективного количества антитела по настоящему

изобретению, которое связывается с человеческим сиглеком-8 (например, антитело к сиглеку-8), или композиции, содержащей указанные антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело находится в фармацевтической композиции, содержащей антитело и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления индивидуумом является человек.

А. Аллергические заболевания глаз

[0068] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к индивидуумам с аллергическим заболеванием глаз (например, аллергическим конъюнктивитом, кератоконъюнктивитом или гигантским папиллярным конъюнктивитом). В некоторых вариантах осуществления у индивидуума аллергический конъюнктивит. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума атопический кератоконъюнктивит. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума весенний кератоконъюнктивит. В некоторых вариантах осуществления у индивидуума гигантский папиллярный конъюнктивит.

[0069] В некоторых вариантах осуществления индивидууму поставлен диагноз аллергического конъюнктивита. В некоторых вариантах осуществления индивидуум подвержен риску развития аллергического конъюнктивита. Аллергический конъюнктивит относится к ряду аллергических заболеваний глаз, характеризующихся аллергической реакцией гиперчувствительности І типа (т.е., опосредованной IgE) конъюнктивы. Известны как сезонные, так и круглогодичные формы, включая сезонный аллергический конъюнктивит, круглогодичный аллергический конъюнктивит (например, атопический конъюнктивит или атопический кератоконъюнктивит) и весенний кератоконъюнктивит.

[0070] В некоторых вариантах осуществления индивидууму поставлен диагноз атопического или весеннего кератоконъюнктивита или у него имеется риск развития атопического или весеннего кератоконъюнктивита. Обе формы кератоконъюнктивита характеризуются аллергическим воспалением глазной поверхности, включая зуд, покраснение, отек и выделения. У людей с весенним кератоконъюнктивитом обычно также присутствуют гигантские папилломы в тарзальной части конъюнктивы, тогда как при атопическом кератоконъюнктивите гигантские папилломы могут присутствовать или нет (La Rosa, M, et al. (2013) Ital. J. Pediatr. 39:18). В то время как весенний кератоконъюнктивит наблюдается только в теплую погоду, атопический кератоконъюнктивит может наблюдается практически без сезонных колебаний.

[0071] В некоторых вариантах осуществления индивидууму поставлен диагноз гигантского папиллярного конъюнктивита или у него имеется риск развития гигантского папиллярного конъюнктивита. Гигантский папиллярный конъюнктивит характеризуется папиллярной гипертрофией (например, верхней тарзальной части конъюнктивы). Часто раздражение и продуцирование IgE вызваны использованием контактных линз, например, из-за накопления белка и/или механического раздражения.

[0072] Симптомы аллергических заболеваний глаз могут включать, без ограничения, зуд конъюнктивы, покраснение конъюнктивы, отек конъюнктивы, выделения из глаз, изъязвление (например, изъязвление конъюнктивы), слезотечение,

гипертрофию век, коркообразование, симблефарон, экзему в периокулярной области, мадароз, фотофобию, кератит, гигантские папилломы, боль в глазах, ощущение инородного тела и катаракту.

[0073] Термины «эталон» или «эталонное значение», используемые в настоящем описании взаимозаменяемо, могут относиться к измерению или характеристике значения или симптома у индивидуума без аллергического заболевания глаз (или в группе таких индивидуумов). «Эталонное значение» может быть абсолютным относительным значением; значением, которое имеет верхний и/или нижний предел; диапазоном значений; средним значением; медианным значением; средним геометрическим значением; или значением, по сравнению с исходным значением. Аналогично, «базовое значение» может быть абсолютным значением; относительным значением; значением, которое имеет верхний и/или нижний предел; диапазоном значений; средним значением; медианным значением; средним геометрическим значением; или значением по сравнению с эталонным значением. Эталонное значение может быть получено для одного индивидуума, двух разных индивидуумов или группы индивидов (например, группы из двух, трех, четырех, пяти или более индивидуумов). В некоторых вариантах осуществления эталонное значение относится к стандартному значению или опорному показателю в данной области. В некоторых вариантах осуществления эталонное значение относится к значению, рассчитанному de novo для одного или более индивидуумов (например, без аллергического заболевания глаз).

[0074] В некоторых вариантах осуществления соскоб с конъюнктивы, полученный от индивидуума, содержит эозинофилы. Анализ соскоба конъюнктивы на наличие эозинофилов можно использовать для диагностики аллергического заболевания глаз (например, весеннего кератоконъюнктивита, как описано в Bonim, S. et al. (2004) Еуе 18:345-351); однако инфильтрация эозинофилов может иметь место в более глубоких тканях конъюнктивы, которые не доступны для поверхностного соскоба (см. Abelson, М.В. et al. (1983) Arch. Ophthalmol. 101:555-556).

[0075] В некоторых вариантах осуществления образец сыворотки, полученный от индивидуума, имеет повышенный уровень IgE по сравнению с индивидуумом без аллергического заболевания глаз. В некоторых вариантах осуществления образец слезы, полученный от индивидуума, имеет повышенный уровень IgE по сравнению с индивидуумом без аллергического заболевания глаз. Методы измерения уровней IgE в образце слезы известны в данной области; см., например, иммунохроматографический тест Allerwatch® для определения общего уровня IgE в слезной жидкости (Hitachi Chemical Co.). Методы измерения уровней IgE в образце сыворотки также известны в данной области (например, сэндвич-радиоиммуноанализ), и описаны нормальные диапазоны для средней концентрации IgE в образце сыворотки, полученном от пациентов разного возраста (см. Нотвигдет HA: Allergic diseases. In Clinical Diagnosis and Management by Laboratory-Methods. 21st edition. New York, WB Saunders Company, 2007, pp. 961-971).

[0076] В некоторых вариантах осуществления аппликационный накожный или

внутрикожный тест на аллергию, выполняемый путем введения индивидууму аллергена, приводит к аллергической реакции. Способы выполнения аппликационного накожного (например, прик-теста, скарификации, пункции или применение пластыря) и внутрикожного (например, внутридермального) теста на аллергию известны в данной области. Как правило, небольшое количество одного или более аллергенов вводят в небольшую область кожи (например, аппликационным или внутрикожным способом, таким как укол иглой или инъекция), после чего врач осуществляет наблюдение на наличие аллергической реакции (например, покраснения, отека, зуда, образования волдырей и т.д.). В некоторых вариантах осуществления аллергическая реакция указывает на IgE-опосредованную реакцию. При аллергических заболеваниях глаз аппликационный накожный или внутрикожный тест на аллергию можно выполнять для оценки гиперчувствительности к содержащимся в воздухе аллергенам, включая, без ограничения, пылевых клещей, перхоти домашних животных и пыльцу.

В. Реакция на лечение

[0077] В некоторых вариантах осуществления введение индивидууму, как описано в настоящем документе (например, индивидууму с аллергическим заболеванием глаз), эффективного количества описанного в настоящей заявке антитела, которое связывается человеческим с сиглеком-8 (например, антитела к сиглеку-8), уменьшает один или более (например, один или более, два или более, три или более, четыре или более и т.д.) симптомов у индивидуума по сравнению с исходным уровнем до введения антитела.

[0078] Термины «базовый уровень» или «базовое значение», взаимозаменяемо используемые в настоящем документе, могут относиться к измерению или характеристике симптома перед введением терапии (например, антитела к сиглеку-8) или в начале введения терапия. Исходное значение можно сравнить с эталонным значением для определения уменьшения или облегчения симптома аллергического заболевания глаз, рассматриваемого в настоящем документе. Эталонное значение и/или исходное значение могут быть получены от одного человека, от двух разных людей или от группы людей (например, группы из двух, трех, четырех, пяти или более индивидуумов).

[0079] Реакцию на лечение у индивидуумов с аллергическим заболеванием глаз можно оценить способами, известными в данной области. Например, реакция на лечение у заболеванием индивидуума аллергическим глаз (например, аллергическим конъюнктивитом, кератоконъюнктивитом или гигантским папиллярным конъюнктивитом) может представлять собой уменьшение или ослабление любого из описанных в настоящей заявке симптомов. Симптомы аллергического заболевания глаз могут включать, без ограничения, зуд конъюнктивы, покраснение конъюнктивы, отек конъюнктивы, выделения из глаз, изъязвление, слезотечение, гипертрофию век, коркообразование, симблефарон, экзему в периокулярной области, мадароз, фотофобию, кератит, гигантские папилломы и катаракту. Реакция на лечение может привести к полной частичной ремиссии (PR) или клиническому улучшению (CI) ремиссии (CR), аллергического заболевания глаз (например, аллергического конъюнктивита,

кератоконъюнктивита или гигантского папиллярного конъюнктивита) у индивидуума.

[0080] В данной области техники известны способы измерения реакции на лечение аллергического заболевания глаз (например, аллергического конъюнктивита, кератоконъюнктивита или гигантского папиллярного конъюнктивита). Например, способы измерения реакции на лечение могут включать, без ограничения, уменьшение одного или более клинических симптомов (например, описанных выше), взятие соскоба конъюнктивы (например, для детектирования эозинофилов) и тестирование уровня IgE в образцах сыворотки и/или слезной жидкости. В некоторых вариантах осуществления для оценки симптомов, связанных с аллергическим заболеванием глаз (например, аллергическим конъюнктивитом, кератоконъюнктивитом или гигантским папиллярным конъюнктивитом) используется опросник на наличие симптомов аллергического конъюнктивита (ACS).

С. Введение

[0081] Для профилактики или лечения заболевания соответствующая доза активного агента будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, как определено выше, тяжести и течения заболевания, от того, вводится ли агент для профилактической или терапевтической цели, предшествующей терапии, истории болезни пациента и реакции на препарат, и от усмотрения лечащего врача. Агент соответственно вводят индивидууму за один раз или в течение нескольких процедур. В некоторых вариантах осуществления интервал между введениями описанного в настоящей заявке антитела к сиглеку-8 (например, антитела, которое связывается с человеческим сиглеком-8) составляет примерно один месяц или более. В некоторых вариантах осуществления интервал между введениями составляет примерно два месяца, примерно три месяца, примерно четыре месяца, примерно пять месяцев, примерно шесть месяцев или более. Используемый в контексте настоящего изобретения интервал между введениями относится к периоду времени между одним введением антитела и следующим введением антитела. Используемый в контексте настоящего изобретения интервал, составляющий примерно один месяц, включает четыре недели. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления интервал между введениями составляет примерно четыре недели, примерно пять недель, примерно шесть недель, примерно семь недель, примерно восемь недель, примерно девять недель, примерно десять недель, примерно одиннадцать недель, примерно двенадцать недель, примерно шестнадцать недель, примерно двадцать недель, примерно двадцать четыре недели или более. В некоторых вариантах осуществления лечение включает несколько введений антитела, причем интервал между введениями может варьировать. Например, интервал между первым введением и вторым введением составляет примерно один месяц, а интервалы между последующими введениями составляют примерно три месяца. В некоторых вариантах осуществления интервал между первым введением и вторым введением составляет примерно один месяц, интервал между вторым введением и третьим введением составляет примерно два месяца, а интервалы между последующими введениями составляют примерно три месяца. В некоторых

вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 (например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8) вводят в фиксированной дозе. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 (например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8) вводят индивидууму в дозе от примерно 0,1 мг до примерно 1800 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 (например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8) вводят индивидууму в дозе, равной примерно любой из следующих доз; 0,1 мг, 0,5 мг, 1 мг, 5 мг, 10 мг, 20 мг, 30 мг, 40 мг, 50 мг, 60 мг, 70 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1100 мг, 1200 мг, 1300 мг, 1400 мг, 1500 мг, 1600 мг, 1700 мг и 1800 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 (например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8) вводят индивидууму в дозе от примерно 150 до примерно 450 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 (например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8) вводят индивидууму в дозе, равной примерно любой из следующих доз: 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг и 450 мг на дозу. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 (например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8) вводят индивидууму в дозе от примерно 0,1 мг/кг до примерно 20 мг/кг на дозу. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 (например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8) вводят индивидууму в дозе от примерно 0,01 мг/кг до примерно 10 мг/кг на дозу. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8, (например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8) индивидууму в дозе от примерно 0,1 мг/кг до примерно 10 мг/кг или от примерно 1,0 мг/кг до примерно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 вводят индивидууму в дозе, примерно равной любой из следующих доз: 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,5 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,5 мг/кг, 4,0 мг/кг, 4,5 мг/кг, 5,0 мг/кг, 5,5 мг/кг, 6,0 мг/кг, 6,5 мг/кг, 7,0 мг/кг, 7,5 мг/кг, 8,0 мг/кг, 8,5 мг/кг, 9,0 мг/кг, 9,5 мг/кг или 10,0 мг/кг. Может быть использована любая из описанных выше частот дозирования. В способах или применениях композиций, описанных в настоящей заявке, можно использовать любую описанную выше частоту дозирования. Эффективность лечения описанным в настоящей заявке антителом (например, антителом, которое связывается с человеческим сиглеком-8) можно оценить с помощью любого описанного в настоящей заявке метода или анализа, выполняемого с интервалами от недели до трех месяцев. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения (например, уменьшение или облегчение одного или более симптомов) оценивают примерно один раз в месяц, примерно каждые два месяца, примерно каждые три месяца, примерно каждые четыре месяца, примерно каждые пять месяцев, примерно каждые шесть месяцев или более после введения антитела, которое

связывается с человеческим сиглеком-8. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения (например, уменьшение или облегчение одного или более симптомов) оценивают примерно каждую неделю, примерно каждые две недели, примерно каждые три недели, примерно каждые четыре недели, примерно каждые пять недель, примерно каждые шесть недель, примерно каждые семь недель, примерно каждые восемь недель, примерно каждые девять недель, примерно каждые десять недель, примерно каждые одиннадцать недель, примерно каждые двенадцать недель, примерно каждые шестнадцать недель, примерно каждые двадцать недель недел

[0082] В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 (например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8) вводят индивидууму ежемесячно в дозе до 3,0 мг/кг путем внутривенной инфузии. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 (например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8) вводят индивидууму ежемесячно в дозе до 3,0 мг/кг путем подкожной инъекции. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 (например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8) вводят индивидууму каждые четыре недели в дозе до 3,0 мг/кг путем внутривенной инфузии. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 (например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8) вводят индивидууму каждые четыре недели в дозе до 3,0 мг/кг путем подкожной инъекции.

[0083] Описанные в настоящей заявке антитела, которые связываются с человеческим сиглеком-8, могут быть использованы по отдельности или в комбинации с другими агентами в описанных в настоящей заявке способах. Например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8, можно вводить вместе с одним или более (например, одним или более, двумя или более, тремя или более, четырьмя или более и т.д.) дополнительными терапевтическими агентами для лечения и/или профилактики аллергического заболевания глаз (например, аллергического конъюнктивита, кератоконъюнктивита или гигантского папиллярного конъюнктивита). Рассматриваемые в настоящей заявке терапевтические агенты включают, без ограничения, кортикостероид (например, будесонид, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон или предизон), антигистаминное средство (например, левокабастина гидрохлорид или олопатадин), кетотифен, азеластин, эпинастин, бепостатин, циклоспорин и нестероидное противовоспалительное средство (НПВП, NSAID).

[0084] Такие, указанные выше, виды комбинированной терапии включают комбинированное введение (при котором два или более терапевтических агента включены в один и тот же или отдельные составы) и раздельное введение, при котором введение антитела по настоящему изобретению может происходить до, одновременно и/или после введения одного или более дополнительных терапевтических агентов. В некоторых вариантах осуществления введение описанного в настоящей заявке антитела к сиглеку-8 и

введение одного или более дополнительных терапевтических агентов происходит в пределах примерно одного месяца, примерно двух месяцев, примерно трех месяцев, примерно четырех месяцев, примерно пяти месяцев или примерно шести месяцев. В некоторых вариантах осуществления введение описанного в настоящей заявке антитела к сиглеку-8 и введение одного или более дополнительных терапевтических агентов происходит в пределах примерно одной недели, примерно двух недель или примерно трех недель. В некоторых вариантах осуществления введение описанного в настоящей заявке антитела к сиглеку-8 и введение одного или более дополнительных терапевтических агентов происходит в пределах примерно одного дня, примерно двух дней, примерно трех дней, примерно четырех дней, примерно пяти дней или примерно шести дней.

[0085] Антитела к сиглеку-8 и/или один или более дополнительных терапевтических агентов можно вводить любым подходящим способом введения, известным в данной области, включая, без ограничения, пероральное введение, подъязычное введение, трансбуккальное введение, топическое введение, ректальное введение, ингаляционное введение, трансдермальное введение, подкожную инъекцию, внутрикожную инъекцию, внутривенную (IV) инъекцию, внутриартериальную инъекцию, внутримышечную инъекцию, внутрисердечную инъекцию, внутрикостную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию, трансмукозальное введение, вагинальное введение, внутривенное введение, внутрисуставное введение, периартикулярное введение, локальное введение, аппликационное накожное введение или любые их комбинации.

D. Антитела

[0086] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к выделенным антителам, которые связываются с человеческим сиглеком-8 (например, антителамагонистам, которое связываются с человеческим сиглеком-8). В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 имеет одну или более из следующих характеристик: (1) связывается с человеческим сиглеком-8; (2) связывается с внеклеточным доменом человеческого сиглека-8; (3) связывается с человеческим сиглеком-8 с более высоким сродством, чем мышиное антитело 2Е2 и/или мышиное антитело 2С4; (4) связывается с человеческим сиглеком-8 с более высокой авидностью, чем мышиное антитело 2Е2 и/или мышиное антитело 2С4; (5) согласно результатам анализа термического сдвига имеет T_m примерно 70-72°C или выше; (6) имеет пониженную степень фукозилирования или является нефукозилированным; (7) связывается с человеческим сиглеком-8, экспрессируемым на эозинофилах и индуцирует апоптоз эозинофилов; (8) связывается с человеческим сиглеком-8, экспрессируемым на тучных клетках и истощает или уменьшает количество тучных клеток; (9) связывается с человеческим сиглеком-8, экспрессируемым на тучных клетках, и ингибирует FceRIактивность тучных клеток (например, высвобождение гистамина, зависимую высвобождение PGD₂, приток Ca^{2+} и/или высвобождение β -гексозаминидазы и т.д.); (10) сконструировано для улучшения активности АДСС; (11) связывается с человеческим сиглеком-8, экспрессируемым на тучных клетках, и убивает тучные клетки за счет

активности ADCC (*in vitro* и/или *in vivo*); (12) связывается с сиглеком-8 человека и примата, не являющегося человеком; (13) связывается с доменом 1, доменом 2 и/или доменом 3 человеческого сиглека-8 или связывается с полипептидом сиглека-8, содержащим домен 1, домен 2 и/или домен 3 человеческого сиглека-8 (например, описанными в настоящей заявке слитыми белками); и (14) истощает активированные эозинофилы с EC_{50} , меньшим по сравнению с EC_{50} мышиного антитела 2E2 или 2C4. Любое из антител, описанных в патенте США № 9546215 и/или WO2015089117 могут найти применение в способах, композициях и наборах, представленных в настоящем изобретении.

[0087] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителам, которые связываются с человеческим сиглеком-8. В некоторых вариантах осуществления изобретения человеческий сиглек-8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления человеческий сиглек-8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается с человеческим сиглеком-8, экспрессируемым на тучных клетках, и истощает или уменьшает количество тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается с человеческим сиглеком-8, экспрессируемым на тучных клетках, и ингибирует опосредованную тучными клетками активность.

[0088] В одном из аспектов изобретение относится к антителам, которые связываются с человеческим сиглеком-8. В некоторых вариантах осуществления человеческий сиглек-8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 72. В некоторых вариантах осуществления человеческий сиглек-8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается с эпитопом в домене 1 человеческого сиглека-8, причем домен 1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается с эпитопом в домене 2 человеческого сиглека-8, причем домен 2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается с эпитопом в домене 3 человеческого сиглека-8, причем домен 3 содержит аминокислоту последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 116, но не связывается со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 117, но не связывается со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 117, но не связывается со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 116. В некоторых вариантах осуществления

описанное в настоящей заявке антитело связывается с линейным эпитопом внеклеточном домене человеческого сиглека-8. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается с конформационным эпитопом во внеклеточном домене человеческого сиглека-8. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается с человеческим сиглеком-8, экспрессируемым на эозинофилах, и индуцирует апоптоз эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается с человеческим сиглеком-8, экспрессируемым на тучных клетках, и истощает тучные клетки. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается с человеческим сиглеком-8, экспрессируемым на тучных клетках, и ингибирует опосредованную тучными клетками активность. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается с человеческим сиглеком-8, экспрессируемым на тучных клетках, и убивает тучные клетки за счет активности АДСС. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело истощает тучные клетки и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело истощает активированные эозинофилы и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело нефукозилированное антитело к сиглеку-8) истощает эозинофилы в крови и ингибирует активацию тучных клеток.

[0089] Настоящее изобретение относится к выделенному антителу к сиглеку-8, которое связывается с сиглеком-8 человека и примата, не относящегося к человеку. Идентификация антител с кросс-реактивностью в отношении приматов была бы полезной для доклинического тестирования антител к сиглеку-8 у приматов, не относящихся к человеку. В одном из аспектов изобретение относится к антителам, которые связываются с сиглеком-8 примата, не относящегося к человеку. В одном из аспектов изобретение относится к антителам, которые связываются с сиглеком-8 человека и сиглеком-8 примата, не являющегося человеком. В некоторых вариантах осуществления сиглек-8 примата, не являющегося человеком, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118 или ее часть. В некоторых вариантах осуществления сиглек-8 примата, не являющегося человеком, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119 или ее часть. В некоторых вариантах осуществления примат, не являющийся человеком, представляет собой павиана (например, *Papio Anubis*). В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8 и сиглеком-8 примата, не являющегося человеком, связывается с эпитопом в домене 1 человеческого сиглека-8. В дополнительном варианте осуществления домен 1 человеческого сиглека-8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8 и сиглеком-8 примата, не являющегося человеком, связывается с эпитопом в домене 3 человеческого сиглека-8. В дополнительном варианте осуществления домен 3 человеческого сиглека-8 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8 и сиглеком-8 примата, не являющегося человеческое антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8 и сиглеком-8 примата, не являющегося человеком, представляет собой мышиное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8 и сиглеком-8 и сиглеком-8 примата, не являющегося человеком, представляет собой мышиное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8 и сиглеком-8 примата, не являющегося человеком, представляет собой человеческое антитело IgG1.

[0090] В одном из аспектов описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 представляет собой моноклональное антитело. В одном из аспектов описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 представляет собой фрагмент антитела (включая антигенсвязывающий фрагмент), например, фрагмент Fab, Fab'-SH, Fv, scFv или (Fab')₂. В одном из аспектов описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 содержит фрагмент антитела (включая антигенсвязывающий фрагмент), например, фрагмент Fab, Fab'-SH, Fv, scFv или (Fab')₂. В одном из аспектов описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 представляет собой химерное, гуманизированное антитело или человеческое антитело. В одном из аспектов любое из описанных в настоящей заявке антител к сиглеку-8 является очищенным.

[0091] В одном из аспектов представлены антитела к сиглеку-8, которые конкурируют с мышиным антителом 2E2 и мышиным антителом 2C4, связывающимися с сиглеком-8. Также представлены антитела к сиглеку-8, которые связываются с тем же эпитопом, что и мышиные антитела 2E2 и 2C4. Мышиные антитела к сиглеку-8, 2E2 и 2C4, описаны в патенте США № 8207305; патенте США № 8197111, патенте США. 7871612 и патенте США № 7557191.

[0092] В одном из аспектов представлены антитела к сиглеку-8, которые конкурируют с любым описанным в настоящей заявке антителом к сиглеку-8 (например, НЕКА, НЕКF, 1C3, 1H10, 4F11, 2C4, 2E2) за связывание с сиглеком-8. Также представлены антитела к сиглеку-8, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из описанных в настоящей заявке антител к сиглека-8 (например, НЕКА, НЕКF, 1C3, 1H10, 4F11, 2C4, 2E2).

[0093] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим антитела к сиглеку-8. В некоторых вариантах осуществления представлены векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие антитела к сиглеку-8. В некоторых вариантах осуществления представлены клетки-хозяева, содержащие такие векторы. В другом аспекте настоящее изобретение относится к композициям, содержащим антитела к сиглеку-8 или полинуклеотиды, кодирующие антитела к сиглеку-8. В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию для лечения аллергического заболевания глаз (например, аллергического конъюнктивита, кератоконъюнктивита или гигантского папиллярного конъюнктивита). В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему

изобретению представляет собой фармацевтическую композицию для профилактики аллергического заболевания глаз (например, аллергического конъюнктивита, кератоконъюнктивита или гигантского папиллярного конъюнктивита).

[0094] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему 1, 2, 3, 4, 5 или 6 последовательностей HVR мышиного антитела 2С4. В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему 1, 2, 3, 4, 5 или 6 последовательностей HVR мышиного антитела 2Е2. В некоторых вариантах осуществления HVR представляет собой CDR по Кабат или CDR по Чотиа.

[0095] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему 1, 2, 3, 4, 5 или 6 последовательностей HVR мышиного антитела 1СЗ. В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему 1, 2, 3, 4, 5 или 6 последовательностей HVR мышиного антитела 4F11. В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему 1, 2, 3, 4, 5 или 6 последовательностей HVR мышиного антитела 1H10. В некоторых вариантах осуществления HVR представляет собой CDR по Кабат или CDR по Чотиа.

[0096] В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается с эпитопом в домене 1 человеческого сиглека-8, причем домен 1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается с эпитопом в домене 2 человеческого сиглека-8, причем домен 2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается с эпитопом в домене 3 человеческого сиглека-8, причем домен 3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114.

[0097] В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 116, но не связывается со слитым белком, содержащим аминокислоту с SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 117, но не связывается со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 115. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 117, но не связывается со слитым белком, содержащим аминокислоту SEQ ID NO: 116.

[0098] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; и/или вариабельная область легкой

цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается с эпитопом в домене 2 человеческого сиглека-8, причем домен 2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 113.

[0099] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; и/или вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и (iii) HVR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается с эпитопом в домене 3 человеческого сиглека-8, причем домен 3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 114. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело связывается с человеческим сиглеком-8 и сиглеком-8 примата, не являющегося человеком.

[0100] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96; и/или вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102 и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с эпитопом в домене 1 человеческого сиглека-8, причем домен 1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с человеческим сиглеком-8 и сиглеком-8 примата, не являющегося человеком.

[0101] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и/или причем вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66.

[0102] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку8, содержащему вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 67-70; и/или причем вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66.

[0103] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и/или причем вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71.

[0104] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 67-70; и/или причем вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71.

[0105] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 88, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; и/или вариабельную область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100, и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 103.

[0106] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95; и/или вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101, и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 104.

[0107] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90, (ii) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93, и (iii) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96; и/или вариабельная область легкой цепи содержит (i) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, (ii) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102, и (iii) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 105.

[0108] Описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 может содержать любую подходящую последовательность каркасного участка вариабельного домена при условии, что антитело сохраняет способность связываться с человеческим сиглеком-8. Используемые в настоящем описании каркасные участки тяжелой цепи обозначены как «HC-FR1-FR4», а каркасные участки легкой цепи обозначены как «LC-FR1-FR4». В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 содержит последовательность каркасного участка вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 26, 34, 38 и 45 (HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3 и HC-FR4, соответственно). В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 содержит последовательность каркасного участка вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 48, 51, 55 и 60 (LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3 и LC-FR4, соответственно). В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 содержит последовательность каркасного участка вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 48, 51, 58 и 60 (LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3 и LC-FR4, соответственно).

[0109] В одном из вариантов осуществления антитело к сиглеку-8 содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность каркасного участка и гипервариабельные области, причем последовательность каркасного участка содержит последовательности HC-FR1-HC-FR4 SEQ ID NO: 26-29 (HC-FR1), SEQ ID NO: 31-36 (HC-FR2), SEQ ID NO: 38-43 (HC-FR3) и SEQ ID NO: 45 или 46 (HC-FR4), соответственно; HVR-H1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; HVR-H2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; и HVR-H3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63. В одном из вариантов осуществления антитело к сиглеку-8 содержит вариабельный домен тяжелой цепи,

содержащий последовательность каркасного участка и гипервариабельные области, причем последовательность каркасного участка содержит последовательности HC-FR1-HC-FR4 SEQ ID NO: 26-29 (HC-FR1), SEQ ID NO: 31-36 (HC-FR2), SEQ ID NO: 38-43 (HC-FR3) и SEQ ID NO: 45 или 46 (HC-FR4), соответственно; HVR-H1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; HVR-H2 содержит аминокислотную HVR-H3 последовательность SEQ ID NO: 62; И содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 67-70. В одном из вариантов осуществления антитело к сиглеку-8 содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность каркасного участка и гипервариабельные области, причем последовательность каркасного участка содержит последовательности LC-FR1-LC-FR4 SEO ID NO: 48 или 49 (LC-FR1), SEO ID NO: 51-53 (LC-FR2), SEO ID NO: 55-58 (LC-FR3) и SEQ ID NO: 60 (LC-FR4), соответственно; HVR-L1 содержит аминокислотную SEO IDNO: 64; HVR-L2 содержит последовательность аминокислотную **SEQ** IDNO: 65; последовательность И HVR-L3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66. В одном из вариантов осуществления антитело к сиглеку-8 содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность каркасного участка области и гипервариабельные области, причем последовательность каркасного участка содержит последовательности LC-FR1-LC-FR4 SEQ ID NO: 48 или 49 (LC-FR1), SEQ ID NO: 51-53 (LC-FR2), SEQ ID NO: 55-58 (LC-FR3) и SEQ ID NO: 60 (LC-FR4), соответственно; HVR-L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; HVR-L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65; и HVR-L3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 71. В одном из вариантов осуществления ЭТИХ антител вариабельный домен тяжелой цепи аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2-10, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16-22. В одном из вариантов осуществления этих антител вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2-10, а вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23 или 24. В одном из вариантов осуществления этих антител вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11-14, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16-22. В одном из вариантов осуществления этих антител вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11-14, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 23 или 24. В одном из вариантов осуществления этих антител вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. В одном из вариантов осуществления этих антител вариабельный домен тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и вариабельный домен легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

- [0110] В некоторых вариантах осуществления последовательности HVR тяжелой цепи содержат:
 - a) HVR-H1 (IYGAH (SEQ ID NO: 61));
 - b) HVR-H2 (VIWAGGSTNYNSALMS (SEQ ID NO: 62)); и
- c) HVR-H3 (DGSSPYYYSMEY (SEQ ID NO: 63); DGSSPYYYGMEY (SEQ ID NO: 67); DGSSPYYYSMDY (SEQ ID NO: 68); DGSSPYYYSMEV (SEQ ID NO: 69); или DGSSPYYYGMDV (SEQ ID NO: 70).
- [0111] В некоторых вариантах осуществления последовательности HVR тяжелой цепи содержат:
- a) HVR-H1 (SYAMS (SEQ ID NO: 88); DYYMY (SEQ ID NO: 89); или SSWMN (SEQ ID NO: 90));
- b) HVR-H2 (IISSGGSYTYYSDSVKG (SEQ ID NO: 91); RIAPEDGDTEYAPKFQG (SEQ ID NO: 92); или QIYPGDDYINYNGKFKG (SEQ ID NO: 93)); и с) HVR-H3 (HETAQAAWFAY (SEQ ID NO: 94); EGNYYGSSILDY (SEQ ID NO: 95); или LGPYGPFAD (SEQ ID NO: 96)).
- [0112] В некоторых вариантах осуществления последовательности FR тяжелой цепи содержат:
 - a) HC-FR1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT (SEQ ID NO: 26);

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLT (SEQ ID NO: 27);

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS (SEQ ID NO: 28); или

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLT (SEQ ID NO: 29));

- b) HC-FR2 (WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO: 31); WVRQAPGKGLEWLG (SEQ ID NO: 32); WVRQAPGKGLEWLS (SEQ ID NO: 33); WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO: 34); WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 35); или WVRQPPGKGLEWLG (SEQ IDNO: 36));
 - c) HC-FR3 (RFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 38);

RLSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 39);

RLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 40);

RFSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 41);

RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 42); или

RLSISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 43)); и

- d) HC-FR4 (WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 45); или WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 46)).
- [0113] В некоторых вариантах осуществления последовательности HVR легкой цепи содержат:
 - a) HVR-L1 (SATSSVSYMH (SEQ ID NO: 64));
 - b) HVR-L2 (STSNLAS (SEQ ID NO: 65); и
 - c) HVR-L3 (QQRSSYPFT (SEQ ID NO: 66); или QQRSSYPYT (SEQ ID NO: 71).
- [0114] В некоторых вариантах осуществления последовательности HVR тяжелой цепи содержат:

- a) HVR-L1 (SASSSVSYMH (SEQ ID NO: 97); RASQDITNYLN (SEQ ID NO: 98); или SASSSVSYMY (SEQ ID NO: 99));
- b) HVR-L2 (DTSKLAY (SEQ ID NO: 100); FTSRLHS (SEQ ID NO: 101); или DTSSLAS (SEQ ID NO: 102)); и
- c) HVR-L3 (QQWSSNPPT (SEQ ID NO: 103); QQGNTLPWT (SEQ ID NO: 104); или QQWNSDPYT (SEQ ID NO: 105)).
 - [0115] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит:

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

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

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

[0116] В некоторых вариантах осуществления последовательности FR легкой цепи содержат:

- a) LC-FR1 (EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO: 48); или EIILTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO: 49);
- b) LC-FR2 (WFQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO: 51); WFQQKPGQAPRLWIY (SEQ ID NO: 52); или WYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO: 53));
 - c) LC-FR3 (GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 55);

GVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 56);

GVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 57); или

GIPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC (SEQ IDNO: 58)); и

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

[0117] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к

антителу к сиглеку-8 (например, гуманизированному антителу к сиглеку-8), которое связывается с человеческим сиглеком-8, причем антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, при этом антитело содержит:

- (а) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий:
- (1) HC-FR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 26-29;
 - (2) HVR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61;
- (3) HC-FR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 31-36;
 - (4) HVR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62;
- (5) HC-FR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 38-43;
 - (6) HVR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; и
- (7) HC-FR4, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 45-46, и/или
 - (b) вариабельный домен легкой цепи, содержащий:
- (1) LC-FR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 48-49;
 - (2) HVR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64;
- (3) LC-FR2, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 51-53;
 - (4) HVR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65;
- (5) LC-FR3, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 55-58;
 - (6) HVR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66; и
 - (7) LC-FR4, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60.
- [0118] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 2-10, и/или содержащему вариабельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 16-22. В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 2-14, и/или содержащему вариабельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 16-24. В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 2-10, и/или содержащему вариабельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 23 или 24. В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 11-14, и/или содержащему вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 16-22. В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 16-22. В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 11-14, и/или

содержащему вариабельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 23 или 24. В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 6; и/или содержащему вариабельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 16 или 21.

[0119] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку8, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 106-108, и/или содержащему вариабельный домен легкой цепи, выбранный из SEQ ID NO: 109-111. В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 106 и/или содержащему вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 109. В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 110. В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку8, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи SEQ ID NO: 108 и/или содержащему вариабельный домен легкой цепи SEQ ID NO: 111.

[0120] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2-14. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 106-108. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, содержит замены, вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело, содержащее такую аминокислотную последовательность, сохраняет способность связываться с человеческим сиглеком-8. В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) происходят в областях за пределами HVR (т.е. в FR). В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 106-108.

[0121] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной

последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 16-24. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 109-111. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность, имеющая 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности, содержит замены, вставки или делеции относительно эталонной последовательности, но антитело, содержащее такую аминокислотную последовательность, сохраняет способность связываться с человеческим сиглеком-8. В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) происходят в областях за пределами HVR (т.е. в FR). В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 содержит вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 21. В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 109-111.

[0122] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему (а) одну, две или три HVR VH, выбранные из представленных в таблице 1, и/или (b) одну, две или три HVR VL, выбранные из представленных в таблице 1.

[0123] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему (а) одну, две или три HVR VH, выбранные из представленных в таблице 2, и/или (b) одну, две или три HVR VL, выбранные из представленных в таблице 2.

[0124] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему (а) одну, две, три или четыре FR VH, выбранные из представленных в таблице 3, и/или (b) одну, две, три или четыре FR VL, выбранные из представленных в таблице 3.

[0125] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу к сиглеку-8, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи и/или вариабельный домен легкой цепи антитела, приведенный в таблице 4, например, антитела НАКА, антитела НАКВ, антитела НАКС и т.д.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности HVR антител

Цепь антитела	HVR1	HVR2	HVR3
	Антит	ело 2E2	
Тяжелая цепь	IYGAH	VIWAGGSTNYNSA	DGSSPYYYSMEY
	SEQ ID NO: 61	LMS	SEQ ID NO: 63
		SEQ ID NO: 62	
Легкая цепь	SATSSVSYMH	STSNLAS	QQRSSYPFT
	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 66

TO DIVIDADE DIVIDADE DIVIDADE				
Гуманизированные варианты тяжелых цепей RHA 2E2, RHB 2E2, RHC 2E2, RHD 2E2,				
RHE 2E2, RHF 2E2, R	RHG 2E2, RHA2 2E2, u	RHB2 2E2		
Тяжелая цепь	IYGAH	VIWAGGSTNYNSA	DGSSPYYYSMEY	
	SEQ ID NO: 61	LMS	SEQ ID NO: 63	
		SEQ ID NO: 62		
Гуманизированные во	ц прианты легкой цепей	RKA 2E2, RKB 2E2, RKC	C 2E2, RKD 2E2, RKE	
2E2, RKF 2E2 u RKG	2E2			
Легкая цепь	SATSSVSYMH	STSNLAS	QQRSSYPFT	
	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 66	
Гуманизированные вс	трианты тяжелых цеп	рей RHE S-G 2E2, RHE E	-D 2E2, RHE Y-V 2E2	
и тройного мутанта	RHE 2E2			
RHE S-G 2E2	IYGAH	VIWAGGSTNYNSA	DGSSPYYYGMEY	
	SEQ ID NO: 61	LMS SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 67	
RHE E-D 2E2	IYGAH	VIWAGGSTNYNSA	DGSSPYYYSMDY	
	SEQ ID NO: 61	LMS SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 68	
RHE Y-V 2E2	IYGAH	VIWAGGSTNYNSA	DGSSPYYYSMEV	
	SEQ ID NO: 61	LMS SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 69	
Три RHE 2E2	IYGAH	VIWAGGSTNYNSA	DGSSPYYYGMDV	
	SEQ ID NO:61	LMS SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 70	
Гуманизированные варианты легких цепей RKA F-Y 2E2 и RKF F-Y 2E2				
RKA F-Y 2E2	SATSSVSYMH	STSNLAS	QQRSSYPYT	
	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 71	
RKF F-Y 2E2	SATSSVSYMH	STSNLAS	QQRSSYPYT	
	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 71	

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

11110 H 7111	T	T		T
Антитело	Цепь	HVR1	HVR2	HVR3
1C3	Тяжелая цепь	SYAMS	IISSGGSYTYYSD	HETAQAAWFA
		SEQ ID NO: 88	SVKG	Y
			SEQ ID NO: 91	SEQ ID NO: 94
1H10	Тяжелая цепь	DYYMY	RIAPEDGDTEYAP	EGNYYGSSILD
		SEQ ID NO: 89	KFQG	Y
			SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 95
4F11	Тяжелая цепь	SSWMN	QIYPGDDYTNYN	LGPYGPFAD
		SEQ ID NO: 90	GKFKG	SEQ ID NO: 96

			SEQ ID NO: 93	
1C3	Легкая цепь	SASSSVSYMH	DTSKLAY	QQWSSNPPT
		SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 100	SEQ ID NO: 103
1H10	Легкая цепь	RASQDITNYL	FTSRLHS	QQGNTLPWT
		N SEQ ID NO:	SEQ ID NO: 101	SEQ ID NO: 104
		98		
4F11	Легкая цепь	SASSSVSYMY	DTSSLAS	QQWNSDPYT
		SEQ ID NO: 99	SEQ ID NO: 102	SEQ ID NO: 105

Таблица 3. Аминокислотные последовательности FR антител

Тяжела	FR1	FR2	FR3	FR4
я цепь				
2E2	QVQLKESGPGL	WVRQPPGKGLE	RLSISKDNSKSQ	WGQGTSVTVSS
	VA	W	VF	(SEQ ID NO: 44)
	PSQSLSITCTVSG	LG	LKINSLQTDDTA	
	FS	(SEQ ID NO:30)	L	
	LT		YYCAR	
	(SEQ ID NO: 25)		(SEQ ID NO: 37)	
RHA	EVQLVESGGGL	WVRQAPGKGLE	RFTISKDNSKNT	WGQGTTVTVSS
2E2	VQ	W	VY	(SEQ ID NO: 45)
	PGGSLRLSCAAS	VS	LQMNSLRAEDT	
	GF	(SEQ ID NO: 31)	AV	
	SLT		YYCAR	
	(SEQ ID NO: 26)		(SEQ ID NO:38)	
RHB	EVQLVESGGGL	WVRQAPGKGLE	RLSISKDNSKNT	WGQGTTVTVSS
2E2	VQ	W	VY	(SEQ ID NO: 45)
	PGGSLRLSCAVS	LG	LQMNSLRAEDT	
	GF	(SEQ ID NO: 32)	AV	
	SLT		YYCAR	
	(SEQ ID NO: 27)		(SEQ ID NO: 39)	
RHC	EVQLVESGGGL	WVRQAPGKGLE	RFTISKDNSKNT	WGQGTTVTVSS
2E2	VQ	W	VY	(SEQ ID NO: 45)
	PGGSLRLSCAVS	VS	LQMNSLRAEDT	
	GF	(SEQ ID NO: 31)	AV	
	SLT		YYCAR	
	(SEQ ID NO: 27)		(SEQ ID NO: 38)	

RHD	EVQLVESGGGL	WVRQAPGKGLE	RFTISKDNSKNT	WGQGTTVTVSS
2E2	VQ	W	VY	(SEQ ID NO: 45)
	PGGSLRLSCAAS	LS	LQMNSLRAEDT	
	GF	(SEQ ID NO: 33)	AV	
	SLT		YYCAR	
	(SEQ ID NO: 26)		(SEQ ID NO: 38)	
RHE	EVQLVESGGGL	WVRQAPGKGLE	RFTISKDNSKNT	WGQGTTVTVSS
2E2	VQ	W	VY	(SEQ ID NO: 45)
	PGGSLRLSCAAS	VG	LQMNSLRAEDT	
	GF	(SEQ ID NO: 34)	AV	
	SLT		YYCAR	
	(SEQ ID NO: 26)		(SEQ ID NO: 38)	
RHF	EVQLVESGGGL	WVRQAPGKGLE	RLTISKDNSKNT	WGQGTTVTVSS
2E2	VQ	W	V	(SEQ ID NO: 45)
	PGGSLRLSCAAS	VS	YLQMNSLRAED	
	GF	(SEQ ID NO: 31)	TA	
	SLT		VYYCAR	
	(SEQ ID NO: 26)		(SEQ ID NO: 40)	
RHG	EVQLVESGGGL	WVRQAPGKGLE	RFSISKDNSKNT	WGQGTTVTVSS
2E2	VQ	W	VY	(SEQ ID NO: 45)
	PGGSLRLSCAAS	VS	LQMNSLRAEDT	
	GF	(SEQ ID NO: 31)	AV	
	SLT		YYCAR	
	(SEQ ID NO: 26)		(SEQ ID NO: 41)	
RHA2	QVQLQESGPGL	WIRQPPGKGLE	RVTISVDTSKNQ	WGQGTLVTVSS
2E2	VK	WI	FS	(SEQ ID NO: 46)
	PSETLSLTCTVS	G	LKLSSVTAADT	
	GG	(SEQ ID NO: 35)	AV	
	SIS		YYCAR	
	(SEQ ID NO: 28)		(SEQ ID NO: 42)	
2E2	QVQLQESGPGL	WVRQPPGKGLE	RLSISKDNSKNQ	WGQGTLVTVSS
RHB2	VK	W	VS	(SEQ ID NO: 46)
	PSETLSLTCTVS	LG	LKLSSVTAADT	
	GF	(SEQ ID NO: 36)	AV	
	SLT		YYCAR	

	(SEQ SD NO: 29)		(SEQ ID NO: 43)	
RHE S-	EVQLVESGGGL	WVRQAPGKGLE	RFTISKDNSKNT	WGQGTTVTVSS
G 2E2	VQ	W	VY	(SEQ ID NO: 45)
	PGGSLRLSCAAS	VG	LQMNSLRAEDT	
	GF	(SEQ ID NO: 34)	AV	
	SLT		YYCAR	
	(SEQ ID NO: 26)		(SEQ ID NO: 38)	
RHE E-	EVQLVESGGGL	WVRQAPGKGLE	RFTISKDNSKNT	WGQGTTVTVSS
D 2E2	VQ	W	VY	(SEQ ID NO: 45)
	PGGSLRLSCAAS	VG	LQMNSLRAEDT	
	GF	(SEQ ID NO: 34)	AV	
	SLT		YYCAR	
	(SEQ ID NO: 26)		(SEQ ID NO: 38)	
RHE Y-	EVQLVESGGGL	WVRQAPGKGLE	RFTISKDNSKNT	WGQGTTVTVSS
V 2E2	VQ	W	VY	(SEQ ID NO: 45)
	PGGSLRLSCAAS	VG	LQMNSLRAEDT	
	GF	(SEQ ID NO: 34)	AV	
	SLT		YYCAR	
	(SEQ ID NO: 26)		(SEQ ID NO: 38)	
Тройно	EVQLVESGGGL	WVRQAPGKGLE	RFTISKDNSKNT	WGQGTTVTVSS
й	VQ	W	VY	(SEQ ID NO: 45)
мутант	PGGSLRLSCAAS	VG	LQMNSLRAEDT	
RHE	GF	(SEQ ID NO: 34)	AV	
2E2	SLT		YYCAR	
	(SEQ ID NO: 26)		(SEQ ID NO: 38)	
Легкая	FR1	FR2	FR3	FR4
цепь				
2E2	QIILTQSPAIMSA	WFQQKPGTSPK	GVPVRFSGSGSG	FGSGTKLEIK
	SP	LW	TS	(SEQ ID NO: 59)
	GEKVSITC	IY	YSLTISRMEAED	
	(SEQ ID NO: 47)	(SEQ ID NO: 50)	A	
			ATYYC	
			(SEQ ID NO: 54)	
RKA	EIVLTQSPATLS	WFQQKPGQAPR	GIPARFSGSGSG	FGPGTKLDIK

	LSP	LL	TD	(SEQ ID NO: 60)
	GERATLSC	IY	FTLTISSLEPEDF	
	(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 51)	AV	
			YYC	
			(SEQ ID NO: 55)	
RKB	EIILTQSPATLSL	WFQQKPGQAPR	GVPARFSGSGSG	FGPGTKLDIK
	SP	L	Т	(SEQ ID NO: 60)
	GERATLSC	WIY	DYTLTISSLEPE	
	(SEQ ID NO: 49)	(SEQ ID NO: 52)	DF	
			AVYYC	
			(SEQ ID NO: 56)	
RKC	EIILTQSPATLSL	WFQQKPGQAPR	GIPARFSGSGSG	FGPGTKLDIK
	SP	LL	TD	(SEQ ID NO: 60)
	GERATLSC	IY	FTLTISSLEPEDF	
	(SEQ ID NO: 49)	(SEQ ID NO: 51)	AV	
			YYC	
			(SEQ ID NO: 55)	
RKD	EIVLTQSPATLS	WFQQKPGQAPR	GIPARFSGSGSG	FGPGTKLDIK
	LSP	L	TD	(SEQ ID NO: 60)
	GERATLSC	WIY	FTLTISSLEPEDF	
	(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 52)	AV	
			YYC	
			(SEQ ID NO: 55)	
RKE	EIVLTQSPATLS	WFQQKPGQAPR	GVPARFSGSGSG	FGPGTKLDIK
	LSP	LL	Т	(SEQ ID NO: 60)
	GERATLSC	IY	DFTLTISSLEPED	
	(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 51)	FA	
			VYYC	
			(SEQ ID NO: 57)	
RKF	EIVLTQSPATLS	WFQQKPGQAPR	GIPARFSGSGSG	FGPGTKLDIK
	LSP	LL	TD	(SEQ ID NO: 60)
	GERATLSC	IY	YTLTISSLEPEDF	
	(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 51)	A	
			VYYC	
			(SEQ ID NO: 58)	

RKG	EIVLTQSPATLS	WYQQKPGQAP	GIPARFSGSGSG	FGPGTKLDIK
	LSP	RL	TD	(SEQ ID NO: 60)
	GERATLSC	LIY	FTLTISSLEPEDF	
	(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 53)	AV	
			YYC	
			(SEQ ID NO: 55)	
RKA F-	EIVLTQSPATLS	WFQQKPGQAPR	GIPARFSGSGSG	FGPGTKLDIK
Y 2E2	LSP	LL	TD	(SEQ ID NO: 60)
	GERATLSC	IY	FTLTISSLEPEDF	
	(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 51)	AV	
			YYC	
			(SEQ ID NO: 55)	
RKF F-	EIVLTQSPATLS	WFQQKPGQAPR	GIPARFSGSGSG	FGPGTKLDIK
Y 2E2	LSP	LL	TD	(SEQ ID NO: 60)
	GERATLSC	IY	YTLTISSLEPEDF	
	(SEQ ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 51)	A	
			VYYC	
			(SEQ ID NO: 58)	

Таблица 4. Аминокислотные последовательности вариабельных областей антител

Название	Вариабельная последовательность	Вариабельная последовательность
антитела	тяжелой цепи	легкой цепи
ch2C4	ch2C4 VH	ch2C4 VK
ch2E2	ch2E2 VH (SEQ ID NO: 1)	ch2E2 VK (SEQ ID NO: 15)
cVHKA	ch2E2 VH (SEQ ID NO: 1)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
cVHKB	ch2E2 VH (SEQ ID NO: 1)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HAcVK	2E2 RHA (SEQ ID NO: 2)	ch2E2 VK (SEQ ID NO: 15)
HBcVK	2E2 RHB (SEQ ID NO: 3)	ch2E2 VK (SEQ ID NO: 15)
HAKA	2E2 RHA (SEQ ID NO: 2)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
HAKB	2E2 RHA (SEQ ID NO: 2)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HAKC	2E2 RHA (SEQ ID NO: 2)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
HAKD	2E2 RHA (SEQ ID NO: 2)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
HAKE	2E2 RHA (SEQ ID NO: 2)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
HAKF	2E2 RHA (SEQ ID NO: 2)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HAKG	2E2 RHA (SEQ ID NO: 2)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)

HBKA	2E2 RHB (SEQ ID NO: 3)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
HBKB	2E2 RHB (SEQ ID NO: 3)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HBKC	2E2 RHB (SEQ ID NO: 3)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
HBKD	2E2 RHB (SEQ ID NO: 3)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
HBKE	2E2 RHB (SEQ ID NO: 3)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
HBKF	2E2 RHB (SEQ ID NO: 3)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HBKG	2E2 RHB (SEQ ID NO: 3)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
HCKA	2E2 RHC (SEQ ID NO: 4)	2E2 RKA (SEQ ED NO: 16)
HCKB	2E2 RHC (SEQ ID NO: 4)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HCKC	2E2 RHC (SEQ ID NO: 4)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
HCKD	2E2 RHC (SEQ ID NO: 4)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
HCKE	2E2 RHC (SEQ ID NO: 4)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
HCKF	2E2 RHC (SEQ ID NO: 4)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HCKG	2E2 RHC (SEQ ID NO: 4)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
HDKA	2E2 RHD (SEQ ED NO: 5)	2E2 RKA (SEQ ED NO: 16)
HDKB	2E2 RHD (SEQ ID NO: 5)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HDKC	2E2 RHD (SEQ ED NO: 5)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
HDKD	2E2 RHD (SEQ ID NO: 5)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
HDKE	2E2 RHD (SEQ ID NO: 5)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
HDKF	2E2 RHD (SEQ ID NO: 5)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HDKG	2E2 RHD (SEQ ID NO: 5)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
HEKA	2E2 RHE (SEQ ID NO: 6)	2E2 RKA (SEQ ED NO: 16)
HEKB	2E2 RHE (SEQ ED NO: 6)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HEKC	2E2 RHE (SEQ ID NO: 6)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
HEKD	2E2 RHE (SEQ ID NO: 6)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
HEKE	2E2 RHE (SEQ ID NO: 6)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
HEKF	2E2 RHE (SEQ ID NO: 6)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HEKG	2E2 RHE (SEQ ID NO: 6)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
HFKA	2E2 RHF (SEQ ID NO: 7)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
HFKB	2E2 RHF (SEQ ID NO: 7)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HFKC	2E2 RHF (SEQ ID NO: 7)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
HFKD	2E2 RHF (SEQ ID NO: 7)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
HFKE	2E2 RHF (SEQ ID NO: 7)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
HFKF	2E2 RHF (SEQ ID NO: 7)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)

HFKG	2E2 RHF (SEQ ID NO: 7)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
HGKA	2E2 RHG (SEQ ID NO: 8)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
HGKB	2E2 RHG (SEQ ID NO: 8)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HGKC	2E2 RHG (SEQ ID NO: 8)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
HGKD	2E2 RHG (SEQ ID NO: 8)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
HGKE	2E2 RHG (SEQ ID NO: 8)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
HGKF	2E2 RHG (SEQ ID NO: 8)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HGHG	2E2 RHG (SEQ ID NO: 8)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
HA2KA	2E2 RHA2 (SEQ ID NO: 9)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
HA2KB	2E2 RHA2 (SEQ ID NO: 9)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HB2KA	2E2 RHB2 (SEQ ID NO: 10)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
HB2KB	2E2 RHB2 (SEQ ID NO: 10)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HA2KF	2E2 RHA2 (SEQ ID NO: 9)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HB2KF	2E2 RHB2 (SEQ ID NO: 10)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HA2KC	2E2 RHA2 (SEQ ID NO: 9)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
HA2KD	2E2 RHA2 (SEQ ID NO: 9)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
HA2KE	2E2 RHA2 (SEQ ID NO: 9)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
HA2KF	2E2 RHA2 (SEQ ID NO: 9)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HA2KG	2E2 RHA2 (SEQ ID NO: 9)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
HB2KC	2E2 RHB2 (SEQ ID NO: 10)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
HB2KD	2E2 RHB2 (SEQ ID NO: 10)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
HB2KE	2E2 RHB2 (SEQ ID NO: 10)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
HA2KFmu	2E2 RHA2 (SEQ ID NO: 9)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
t		
HB2KFmut	2E2 RHB2 (SEQ ID NO: 10)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
HEKAmut	2E2 RHE (SEQ ID NO: 6)	2E2 RKA F-Y mut (SEQ ID NO: 23)
HEKFmut	2E2 RHE (SEQ ID NO: 6)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
HAKFmut	2E2 RHA (SEQ ID NO: 2)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
HBKFmut	2E2 RHB (SEQ ID NO: 3)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
HCKFmut	2E2 RHC (SEQ ID NO: 4)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
HDKFmut	2E2 RHD (SEQ ID NO: 5)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
HFKFmut	2E2 RHF (SEQ ID NO: 7)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
HGKFmut	2E2 RHG (SEQ ID NO: 8)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
RHE Y-	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO: 13)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)

VKA		
RHE Y-	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO: 13)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
VKB		
RHE Y-	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO: 13)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
VKC		
RHE Y-	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO: 13)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
VKD		
RHE Y-	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO: 13)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
VKE		
RHE Y-	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO: 13)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
VKF		
RHE Y-	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO: 13)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
VKG		
RHE E-	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO: 12)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
DKA		
RHE E-	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO: 12)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
DKB		
RHE E-	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO: 12)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
DKC		
RHE E-	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO: 12)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
DKD		
RHE E-	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO: 12)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
DKE		
RHE E-	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO: 12)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
DKF		
RHE E-	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO: 12)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
DKG		
RHE E-	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO: 12)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
DKFmut RHE S-	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO: 11)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
GKA	2L2 KIL 5-0 (SEQ ID NO. 11)	ZLZ KKA (SLQ ID NO. 10)
RHE S-	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO: 11)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
GKB	2E2 DHE C C (SEQ ID NO. 11)	2E2 BVC (SEO ID NO. 19)
RHE S-GKC	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO: 11)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
RHE S-	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO: 11)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
GKD RHE S-	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO: 11)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
17.11. 3-	202 MIL 5-0 (SEQ ID NO. 11)	2L2 KKL (SLQ ID NO. 20)

GKE		
RHE S-	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO: 11)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
GKF	222 Talle 8 8 (828 12 176.11)	222 1411 (82
RHE S-	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO: 11)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
GKG	2E2 RIE 5 6 (SEQ ID 110. 11)	2L2 Id(6 (SEQ ID 1(6, 22)
RHE	Тройной мутант RHE 2E2 (SEQ ID	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
Triple-KA	NO: 14)	ZEZ Idiri (SEQ ID 110. 10)
RHE	Тройной мутант RHE 2E2 (SEQ ID	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
Triple-KB	NO: 14)	ZEZ KKB (SEQ ID NO. 17)
RHE	Тройной мутант RHE 2E2 (SEQ ID	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
Triple-KC	NO: 14)	2E2 RRC (SEQ ID NO. 18)
RHE	,	2E2 DVD (SEO ID NO: 10)
	Тройной мутант RHE 2E2 (SEQ ID	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
Triple-KD	NO: 14)	AEA BIZE (GEO ID NO. AO)
RHE	Тройной мутант RHE 2E2 (SEQ ID	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
Triple-KE	NO: 14)	
RHE	Тройной мутант RHE 2E2 (SEQ ID	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
Triple-KF	NO: 14)	
RHE	Тройной мутант RHE 2E2 (SEQ ID	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
Triple-KG	NO: 14)	
RHE	Тройной мутант RHE 2E2 (SEQ ID	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
Triple-	NO: 14)	
KFmut		
RHE Y-	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO: 13)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
VKFmut		
RHE E-	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO: 12)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
DKFmut	()	

[0126] Существуют пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющих тяжелые цепи, обозначенные как α , β , ϵ , γ , и μ , соответственно. Классы γ и α дополнительно подразделяются на подклассы, например, у людей выделяют следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Антитела IgG1 могут существовать в многочисленных полиморфных вариантах, называемых аллотипами (см. Jefferis and Lefranc 2009. mAbs Vol. 1 Issue 4 1-7), любой из которых подходит для использования в некоторых из вариантов осуществления настоящего изобретения. Распространенными аллотипными вариантами в популяциях человека являются те, которые обозначены буквами a, f, n, z или их комбинации. В любом из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело может содержать Fc-область тяжелой цепи, содержащую Fc-область человеческого IgG. В других вариантах осуществления Fc-область человеческого IgG содержит человеческий IgG1 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело IgG4. В некоторых вариантах осуществления человеческий IgG4 содержит аминокислотную замену S228P, причем аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с EU индексом, как у Кабат. В некоторых вариантах осуществления человеческий IgG1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78. В некоторых вариантах осуществления человеческий IgG4 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79.

[0127] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к антителу к

сиглеку-8, содержащему тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 76 или 77. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 87; и/или легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76. В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 индуцирует апоптоз активированных эозинофилов. В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 индуцирует апоптоз эозинофилов, находящихся в покое. В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 истощает активированные эозинофилы и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 истощает или уменьшает количество тучных клеток и ингибирует активацию тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 истощает или уменьшает количество тучных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 вызывает гибель тучных клеток благодаря активности АОСС. В некоторых вариантах осуществления антитело истощает или уменьшает в ткани количество тучных клеток, экспрессирующих сиглек-8. В некоторых вариантах осуществления антитело истощает или уменьшает в биологической жидкости количество тучных клеток, экспрессирующих сиглек-8.

1. Сродство антитела

[0128] В некоторых аспектах антитело к сиглеку-8, описанное в настоящей заявке, связывается с человеческим сиглеком-8 с примерно таким же или более высоким сродством и/или более высокой авидностью по сравнению с мышиным антителом 2Е2 и/или мышиным антителом 2С4. В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8, представленное в настоящем описании, имеет константу диссоциации (Kd) ≤ 1 мкМ, ≤150 нМ, ≤100 нМ, ≤50 нМ, ≤10 нМ, ≤1 нМ, ≤0,1 нМ, ≤0,01 нМ или ≤0,001 нМ (например, 10^{-8} M или менее, например, от 10^{-8} M до 10^{-13} M, например, от 10^{-9} Mт до 10^{-13} М). В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8, описанное в настоящей заявке, связывается с человеческим сиглеком-8 со сродством, примерно в 1,5 раза, примерно в 2 раза, примерно в 3 раза, примерно в 4 раза, примерно в 5 раз, примерно в 6 раз, примерно в 7 раз, примерно в 8 раз, примерно в 9 раз или примерно в 10 раз превышающим сродство мышиного антитела 2Е2 и/или мышиного антитела 2С4. В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16 или 21

[0129] В одном из вариантов осуществления сродство связывания антитела к сиглеку-8 можно определить с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса. Например, Кd или значение Kd может быть измерено с помощью BIAcoreTM-2000 или BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25°C с использованием чипов с иммобилизованным антигеном CM5 при ~10 единиц ответа (RU). Вкратце, биосенсорные

чипы с карбоксиметилированным декстраном (СМ5, BIAcore® Inc.) активируют гидрохлоридом N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) в соответствии с инструкциями поставщика. Антитела для захвата (например, античеловеческий Fc) разбавляют 10 мМ ацетата натрия, рН 4,8 перед инъекцией, проводимой со скоростью потока 30 мкл/мин, и дополнительно иммобилизуют антитела к сиглеку-8. Для измерения кинетических параметров двукратные серийные разведения димерного сиглека-8 вводят в PBS с 0,05% Твин 20 (PBST) при 25°C со скоростью потока примерно 25 мкл/мм. Скорости ассоциации (kon) и скорости диссоциации (koff) вычисляют с помощью модели Ленгмюра, модели простого связывания 1:1 (BIAcore® Evaluation Software version 3.2), путем одновременного подбора сенсограмм ассоциации и диссоциации. Равновесную константу диссоциации (Kd) вычисляют как отношение koff/kon, см., например, Chen Y. et al. (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881.

[0130] В другом варианте осуществления для определения сродства связывания антител к сиглеку-8 с сиглеком-8 можно использовать биослойную интерферометрию. В одном из примеров анализа сиглек-8-Fc меченый белок иммобилизуют на датчиках захвата античеловеческих фрагментов и инкубируют с увеличивающимися концентрациями мышиных, химерных или гуманизированных Fab-фрагментов к сиглеку-8 для измерения сродства с помощью инструмента, например, такого как система Octet Red 384 (ForteBio).

[0131] Сродство связывания антитела к сиглеку-8 также может быть определено, например, с помощью анализа Скэтчарда, описанного в Munson et al. Anal. Biochem., 107:220 (1980), с использованием стандартных методов, хорошо известных в соответствующей области. См. также Scatchard, G., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660 (1947).

2. Авидность антител

[0132] В некоторых вариантах авидность связывания антитела к сиглеку-8 можно определить с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса. Например, Кd или значение Kd можно измерить с помощью BIAcore T100. Антитело для захвата (например, козий античеловеческий-Fc и козий антимышиный-Fc) иммобилизуют на чипе CMS. На поверхности проточных кювет могут быть иммобилизованы античеловеческие или антимышиные антитела. Анализ проводят при определенной температуре и скорости потока, например, при 25°C и скорости потока 30 мкл/мин. Димерный сиглек-8 разводят в буфере для анализа в различных концентрациях, например, в концентрации от 15 нМ до 1,88 пМ. Антитела захватывают и выполняют высокоэффективные инъекции с последующей диссоциацией. Проточные кюветы регенерируют с помощью буфера, например, 50 мМ глицина, рН 1,5. Получают результаты для холостых проб с пустой эталонной ячейкой и многократными инъекциями буфера для анализа и анализируют, используя глобальные параметры соответствия 1:1.

3. Конкурентный анализ

[0133] Конкурентные анализы можно использовать для определения того, связываются ли два антитела с одним и тем же эпитопом путем распознавания

идентичных или стерически перекрывающихся эпитопов, или одно антитело конкурентно ингибирует связывание другого антитела с антигеном. Эти анализы известны в данной области. Обычно антиген или клетки, экспрессирующие антиген, иммобилизуют на поверхности многолуночного планшета и измеряют способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител. Обычными метками в таких конкурентных анализах являются радиоактивные метки или ферментные метки. В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8, описанное в настоящей заявке, конкурирует с настоящей заявке антителом 2Е2 за связывание с эпитопом, присутствующим на клеточной поверхности (например, тучной клетки). В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8, описанное в настоящей заявке, конкурирует с антителом, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 15, за связывание с эпитопом, присутствующим на клеточной поверхности (например, тучной клетки). В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8, описанное в настоящей заявке, конкурирует с описанным в настоящей заявке антителом 2С4 за связывание с эпитопом, присутствующим на клеточной поверхности (например, тучной клетки). В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 конкурирует с антителом, содержащим вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (как описано в патенте США № 8207305), и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (как описано в патенте США № 8207305), за связывание с эпитопом, присутствующим на клеточной поверхности (например, тучной клетки).

4. Термическая стабильность

[0134] В некоторых аспектах антитело к сиглеку-8, описанное в настоящей заявке, имеет температуру плавления (Тт), согласно результатам анализа термического сдвига, равную по меньшей мере примерно 70°C, по меньшей мере примерно 71°C или по меньшей мере примерно 72°C. В одном из примеров анализа термического сдвига содержащие гуманизированное антитело к сиглеку-8, инкубируют с образцы, флуоресцентным красителем (Sypro Orange) в течение 71 цикла с увеличением температуры на 1°C за цикл в кПЦР термоциклере для определения Тт. В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 имеет сходную или более высокую Тт по сравнению с мышиным антителом 2E2 и/или мышиным антителом 2C4. В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 16 или 21. В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 имеет такую же или более высокую Тт по сравнению с химерным антителом 2С4. В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8 имеет такую же или

более высокую Tm по сравнению с антителом, имеющим тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85.

5. Анализ биологической активности

[0135] В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 истощает тучные клетки. Анализы для оценки апоптоза клеток хорошо известны в настоящей области, например, окрашивание аннексином V и анализ TUNNEL.

[0136] В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 индуцирует активность АДСС. В некоторых осуществления описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 убивает тучные клетки, экспрессирующие сигек-8, благодаря активности АДСС. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит нефукозилированные (т.е. афукозилированные) антитела к сиглеку-8. В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая описанные в настоящей заявке нефукозилированные антитела к сиглеку-8, усиливает активность АДСС по сравнению с композицией, содержащей частично фукозилированные антитела к сиглеку-8. Анализы для оценки активности АДСС хорошо известны в данной области и описаны в настоящей заявке. В типичном анализе измерения активности АDCC используются эффекторные клетки и клетки-мишени. Примеры эффекторных клеток включают клетки естественных киллеров (NK), большие гранулярные лимфоциты (LGL), лимфокин-активированные киллеры (LAK) и PBMC, содержащие NK и LGL, или лейкоциты, имеющие Fc-рецепторы на клеточных поверхностях, такие как нейтрофилы, эозинофилы и макрофаги. Эффекторные клетки могут быть выделены из любого источника, включая индивидуумов с представляющим интерес заболеванием (например, аллергическим заболеванием глаз). Клеткой-мишенью является любая клетка, которая экспрессирует на клеточной поверхности антигены, которые могут распознаваться антителами, подлежащими оценке. Примером такой клетки-мишени являются тучные клетки, который экспрессирует сиглек-8 на своей поверхности. Другим примером такой клетки-мишени является клеточная линия (например, клеточная линия Ramos), которая экспрессирует сиглек-8 на клеточной поверхности (например, Ramos 2C10)). Клеткимишени могут быть мечены реагентом, который позволяет обнаружить цитолиз. Примеры реагентов для мечения включают радиоактивное вещество, такое как хромат натрия (Na₂⁵¹CrO₄). См., например, Immunology, 14, 181 (1968); J. Immunol. Methods., 172, 227 (1994); J. Immunol. Methods., 184, 29 (1995).

[0137] В другом типичном анализе для оценки ADCC и апоптотической активности антител к сиглеку-8 в отношении тучных клеток, человеческие тучные клетки выделяют из человеческих тканей или биологических жидкостей в соответствии с опубликованными протоколами (Guhl et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 2011, 75:382-384; Kuika et al., In Current Protocols in Immunology, 2001, (John Wiley & Sons, Inc.)) или осуществляют их дифференцировку из человеческих гематопоэтических стволовых клеток, например, как

описано Yokoi et al. J. Allergy Clin Immunol., 2008, 121:499-505. Очищенные тучные клетки ресуспендируют в среде Complete RPMI в стерильном 96-луночном планшете с U-дном и инкубируют в присутствии или отсутствии антител к сиглеку-8 в течение 30 минут в концентрациях в диапазоне от 0,0001 нг/мл до 10 мкг/мл. Образцы инкубируют в течение еще 4-48 часов с очищенными естественными киллерами (NK) или без них или со свежеприготовленными PBL и без них, чтобы индуцировать ADCC. Уничтожение клеток путем апоптоза или ADCC анализируют с помощью проточной цитометрии, используя флуоресцентные конъюгированные антитела для обнаружения тучных клеток (CD117 и FceR1) и аннексин-V и 7AAD для возможности отличить живые клетки от мертвых или умирающих клеток. Окрашивание аннексином-V и 7AAD выполняют в соответствии с инструкциями производителя.

[0138] В некоторых аспектах описанное в настоящей заявке антитело к сиглеку-8 ингибирует опосредованную тучными клетками активность. Триптазу тучных клеток используют в качестве биомаркера для общего количества тучных клеток и их активации. Например, для оценки уменьшения количества тучных клеток в крови или моче могут быть измерены общая и активная триптаза, а также гистамин, N-метил гистамин и 11-бета-простагландин F2. См., например, публикацию заявки на патент США № 20110293631, где описан пример анализа активности тучных клеток.

Е. Получение антител.

[0139] Антитело, описанное в настоящей заявке (например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8), получают методами, доступными в данной области для получения антител, примеры которых более подробно описаны в приведенных ниже разделах.

1. Фрагменты антител.

[0140] Настоящее изобретение включает фрагменты антител. Фрагменты антител могут быть получены традиционными способами, такими как ферментативное расщепление, или рекомбинантными методами. В определенных обстоятельствах преимущество дает использование фрагментов антител, а не целых антител. Для обзора некоторых фрагментов антител см. Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134.

[0141] Разработаны различные способы получения фрагментов антител. Традиционно такие фрагменты получают в результате протеолитического расщепления интактных антител (см., например, Morimoto et al. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); и Brennan et al. Science, 229:81 (1985))). Однако сегодня эти фрагменты могут быть продуцированы непосредственно рекомбинантными клетками-хозяевами. Все фрагменты антител Fab, Fv и ScFv можно экспрессировать в *E.coli* и секретировать из них, что позволяет легко продуцировать большие количества этих фрагментов. Фрагменты антител могут быть выделены из упомянутых выше фаговых библиотек антител. Альтернативно, фрагменты Fab'-SH могут быть извлечены непосредственно из *E.coli* и химически связаны с образованием F(ab')₂ фрагментов (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Согласно другому подходу F(ab')₂ фрагменты

могут быть выделены непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Фрагменты Fab и F(ab')₂ с увеличенным периодом полувыведения *in vivo*, содержащие остатки эпитопа, связывающего рецептор спасения, описан в патенте США № 5869046. Другие способы получения фрагментов антител также очевидны специалисту в данной области. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (scFv). См. WO 93/16185; патенты США №№ 5571894 и 5587458. Fv и scFv являются единственными видами с интактными антигенсвязывающими участками, которые лишены константных областей; таким образом, они могут быть пригодны для снижения неспецифического связывания при использовании *in vivo*. Слитые белки scFv могут быть сконструированы для получения слитого эффекторного белка либо по амино-, либо по карбокси-концу scFv. См. Antibody Engineering, изд. Воггеbaeck, выше. Фрагмент антитела также может представлять собой «линейное антитела», например, как описано в патенте США № 5643870. Такие линейные антитела могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

2. Гуманизированные антитела.

[0142] Настоящее изобретение включает гуманизированные антитела. В данной области известны различные способы гуманизации нечеловеческих антител. Например, гуманизированное антитело может иметь один или более аминокислотных остатков, введенных в него из источника, который не является человеком. Эти нечеловеческие аминокислотные остатки часто называют «импортируемыми» остатками, которые обычно берут из «импортируемого» вариабельного домена. По существу, гуманизация может быть выполнена по методу Винтера (Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536) путем замены гипервариабельной области соответствующими последовательности человеческого Соответственно, последовательностями антитела. такими "гуманизированными" антителами являются химерные антитела (патент США № 4816567), в которых по существу участок, более короткий, чем интактный человеческий вариабельный домен, замещен соответствующей последовательностью нечеловеческого вида. На практике гуманизированные антитела обычно представляют собой человеческие антитела, в которых некоторые остатки гипервариабельной области и, возможно, некоторые остатки FR замещены остатками из аналогичных участков антител грызунов.

[0143] Выбор человеческих вариабельных доменов, как легких, так и тяжелых, для использования при получении гуманизированных антител может быть важным для уменьшения антигенности. В соответствии с так называемым методом «наилучшего соответствия» осуществляют скрининг всей библиотеки известных человеческих последовательностей вариабельных доменов относительно последовательности вариабельного домена антитела грызуна (например, мыши). Затем человеческую последовательность, которая наиболее близка к последовательности грызуна, принимают в качестве человеческой основы для гуманизированного антитела (Sims et al. (1993), J.

Immunol. 151:2296; Chothiaetal. (1987) J. Mol. Biol. 196:901). В другом методе используется конкретный каркас, полученный из консенсусной последовательности всех человеческих антител определенной подгруппы легких или тяжелых цепей. Такой же каркас можно использовать для нескольких различных гуманизированных антител (Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta et al. (1993) J. Immunol. 151:2623).

[0144] Кроме того, желательно, чтобы антитела были гуманизированы с сохранением высокого сродства к антигену и других благоприятных биологических свойств. Для достижения этой цели, согласно одному из способов, гуманизированные антитела получают с помощью анализа родительских последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей родительских И гуманизированных последовательностей. Трехмерные иммуноглобулинов являются общедоступными и знакомы специалистам в данной области. Имеются компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают возможные трехмерные конформационные структуры выбранных последовательностей иммуноглобулина-кандидата. Изучение этих дисплеев позволяет проанализировать вероятную роль остатков в функционировании последовательности иммуноглобулинакандидата, т.е. выполнить анализ остатков, которые влияют на способность иммуноглобулина-кандидата связываться со своим антигеном. Таким образом, для достижения требуемых характеристик антитела, таких как повышенное сродство к целевому антигену(ам), могут быть отобраны и объединены остатки FR из реципиентных и импортируемых последовательностей. Как правило, остатки гипервариабельной области непосредственно и существенным образом влияют на связывание антигена.

3. Человеческие антитела

[0145] Человеческие антитела к сиглеку-8 по настоящему изобретению могут быть сконструированы путем объединения последовательности(ей) вариабельного домена клона Fv, выбранной из библиотек фагового дисплея человека, с известной последовательностью(ями) человеческого константного домена. Альтернативно, человеческие моноклональные антитела к сиглеку-8 по настоящему изобретению могут быть получены способом гибридомы. Клеточные линии человеческой миеломы и мышиной гетеромиеломы для продуцирования человеческих моноклональных антител описаны, например, в Kozbor. J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); и Boerner et al., J. Immunol., 147:86 (1991).

[0146] Можно получить трансгенных животных (например, мышей), которые способны после иммунизации продуцировать полный репертуар человеческих антител, не продуцируя при этом эндогенный иммуноглобулин. Например, описано, что гомозиготная делеция гена в шарнирной области (ЈН) тяжелой цепи антитела у химерных мышей и мышей с мутантной зародышевой линией приводит к полному ингибированию продуцирования эндогенных антител. Перенос массива генов человеческого иммуноглобулина зародышевой линии в такую мышь с мутантной зародышевой линией

приведет к выработке человеческих антител после заражения антигеном. См., например, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993).

[0147] Также можно использовать перестановку генов для получения человеческих антител из антител, не относящихся к человеку (например, грызунов), причем человеческое антитело имеет сходство и специфичность исходного нечеловеческого антитела. Согласно этому способу, который также называют «импринтингом эпитопа», вариабельную область тяжелой или легкой цепи фрагмента нечеловеческого антитела, полученного методами фагового дисплея, описанными в настоящей заявке, заменяют набором генов человеческого V-домена, создавая популяцию scFv или Fab химер нечеловеческих цепей/человеческих цепей. Выбор с помощью антигена приводит к выделению scFv или Fab химер нечеловеческих цепей/человеческих цепей, в которых человеческая цепь восстанавливает антигенсвязывающий участок, разрушенный при удалении соответствующей нечеловеческой цепи в первичном клоне фагового дисплея, т.е. эпитоп управляет выбором человеческой цепочки-партнера. Когда процесс повторяют для замены оставшейся нечеловеческой цепи, получают человеческое антитело (см. РСТ WO 93/06213, опубликованную 1 апреля 1993 г.). В отличие от традиционной гуманизации нечеловеческих антител с помощью трансплантации CDR, этот метод обеспечивает полностью человеческие антитела, которые не имеют остатков FR или CDR нечеловеческого происхождения.

4. Биспецифические антитела.

[0148] Биспецифические антитела представляют собой моноклональные антитела, которые обладают специфичностью связывания по меньшей мере по отношению к двум разным антигенам. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела представляют собой человеческие или гуманизированные антитела. В некоторых вариантах осуществления одна из специфичностей связывания относится к сиглеку-8, а другая относится к любому другому антигену. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела могут связываться с двумя разными эпитопами сиглека-8. Биспецифические антитела также можно использовать для локализации цитотоксических агентов в клетках, которые экспрессируют сиглек-8. Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, F(ab')₂-биспецифические антитела).

[0149] Способы получения биспецифических антител известны в данной области. См. Milstein and Cuello, Nature, 305:537 (1983), WO 93/08829, опубликованную 13 мая 1993 г., и Traunecker et al., EMBO J., 10:3655 (1991). Более детальную информацию о получении биспецифических антител см., например, Suresh et al. Methods в Enzymology, 121:210 (1986). Биспецифические антитела включают сшитые или «гетероконъюгатные» антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть связано с авидином, другое с биотином. Гетероконъюгатные антитела могут быть получены любым удобным методом сшивания. Подходящие сшивающие агенты хорошо известны в данной области и

раскрыты в патенте США № 4676980, наряду с другими методами сшивания.

5. Однодоменные антитела.

[0150] В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению представляет собой однодоменное антитело. Однодоменное антитело представляет собой единственную полипептидную цепь, включающую весь или часть вариабельного домена тяжелой цепи или весь или часть вариабельного домена легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; см., например, патент США № 6248516 В1). В одном из вариантов осуществления однодоменное антитело состоит из полного или части вариабельного домена тяжелой цепи антитела.

6. Варианты антител.

[0151] В некоторых вариантах осуществления предлагаются модификация(ии) аминокислотной последовательности описанных в настоящей заявке антител. Например, может появиться потребность в улучшении сродства связывания и/или других биологических свойств антитела. Варианты аминокислотной последовательности антитела могут быть получены путем внесения соответствующих изменений в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, или путем пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции и/или вставки и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антитела. Для получения конечной конструкции возможно использование любой комбинации делеций, вставок и замен при условии, что конечная конструкция имеет требуемые характеристики. В процессе получения заявленного антитела в аминокислотную последовательность могут быть введены аминокислотные замены.

[0152] Полезный способ идентификации определенных остатков или областей антитела, которые являются предпочтительными местами для мутагенеза, называется «аланин-сканирующим мутагенезом», описанный Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085. В этом случае, остаток или группу целевых остатков идентифицируют (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) и заменяют нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином), с целью оказания влияния на взаимодействие аминокислоты с антигеном. аминокислотные положения, которые демонстрируют функциональную чувствительность к заменам, затем уточняют путем введения дополнительных или других вариантов в участки замены или для других участков замены. Таким образом, хотя участок для введения варианта аминокислотной последовательности предопределен, природа мутации как таковой не обязательно является предопределенной. Например, чтобы проанализировать эффективность мутации на заданном участке, в целевом кодоне или области выполняют ala-сканирование или используют случайный мутагенез, и экспрессированные иммуноглобулины подвергают скринингу на наличие требуемой активности.

[0153] Вставки аминокислотной последовательности включают слияния амино-и/или карбоксильного конца длиной от одного остатка до полипептидов длиной сто или более остатков, а также вставки внутри последовательности из одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метионильным остатком. Другие варианты молекулы антитела со вставкой включают слияние с N- или C-концом антитела с ферментом или полипептидом, который увеличивает период полувыведения антитела из сыворотки.

[0153] В некоторых вариантах осуществления в моноклональных антителах происходит отщепление С-конца тяжелой цепи и/или легкой цепи. Например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков отщепляются от С-конца тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления при отщеплении С-конца происходит удаление С-концевого лизина из тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления в моноклональных антителах происходит отщепление N-конца тяжелой цепи и/или легкой цепи. Например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков отщепляются от N-конца тяжелой цепи и/или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления усеченные формы моноклональных антител могут быть получены рекомбинантными методами.

[0155] В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению изменяют для увеличения или уменьшения степени гликозилирования антитела. Гликозилирование полипептидов обычно является либо N-связанным, либо Освязанным. N-связанное гликозилирование относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-Х-серин и аспарагин-Х-треонин, где Х представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. О-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы, к гидроксиаминокислоте, чаще всего серину или треонину, хотя также может быть использован 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

[0156] Добавление или удаление сайтов гликозилирования в антителе удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности так, чтобы происходило формирование или удаление одной или более из описанных выше трипептидных последовательностей (для N-связанных сайтов гликозилирования). Изменение также можно осуществлять путем добавления, делеции или замены одного или более остатков серина или треонина в последовательности исходного антитела (для Освязанных сайтов гликозилирования).

[0157] Если антитело содержит Fc-область, может быть изменен присоединенный к нему углевод. Например, антитела со зрелой углеводной структурой, в которой отсутствует фукоза, присоединенная к Fc-области антитела, описаны в заявке на патент США № 2003/0157108 (Presta, L.). См. также US 2004/0093621 (KyowaHakko Kogyo Co.,

Ltd). Антитела с биссекторным N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) в углеводе, присоединенном к Fc-области антитела, упоминаются в WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. и патенте США № 6602684, Umana et al. Антитела с по меньшей мере одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-области антитела, описаны в WO 1997/30087, Patel et al. См. также WO 1998/58964 (Raju, S.) и WO 1999/22764 (Raju, S.), касающиеся антител с измененным углеводом, присоединенным к его Fc-области. См. также заявку на патент США № 2005/0123546 (Umana et al.), относящуюся к антигенсвязывающим молекулам с модифицированным гликозилированием.

[0158] В некоторых вариантах осуществления вариант гликозилирования содержит Fc-область, в котором углеводная структура, присоединенная к Fc-области, лишена фукозы. Такие варианты имеют улучшенную функцию АДСС. Необязательно, Fc-область дополнительно содержит одну или более аминокислотных замен, которые дополнительно улучшают АДСС, например, замены в положениях 298, 333 и/или 334 Fc-области (Еи нумерация остатков). Примеры публикаций, относящихся к «дефукозилированным» или «фукозо-дефицитным» антителам, включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004). Примеры клеточных линий, продуцирующих дефукозилированные антитела, включают клетки Lee 13 СНО, дефицитные по фукозилированию белка (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); заявка на патент США № 2003/0157108 A1, Presta, L; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., см, в частности пример 11), и клеточные линии с нокаутом гена, таким как ген альфа-1,6-фукозитрансферазы, FUT8, нокаутные клетки CHO (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)сверхэкспрессирующие β1,4-Nклетки ацетилгликозинилтрансферазу III (GnT-III) и µ-маннозидазу Гольджи II (ManII).

[0159] Настоящее изобретение относится к антителам, которые имеют пониженный уровень фукозы относительно количества фукозы в том же антителе, которое продуцирует клетка СНО дикого типа. Например, антитело имеет меньшее количество фукозы, чем если бы оно продуцировалось нативными клетками СНО (например, клеткой СНО с нативным паттерном гликозилирования, например клеткой СНО, содержащей нативный ген FUT8). В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8, представленное в настоящем описании, представляет собой антитело, в котором менее чем примерно 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% или 1% N-связанных гликанов содержат фукозу. В некоторых вариантах осуществления антитело к сиглеку-8, представленное в настоящем описании, представляет собой антитело, в котором ни один из N-связанных гликанов не содержит фукозы, т.е. в которых антитело полностью не содержит фукозы, или не имеет фукозы, или не является фукозилированным, или является афукозилированным. Количество фукозы может быть определено путем вычисления среднего количества фукозы в сахарной цепи в Asn297 по отношению к сумме всех гликоструктур, связанных с Asn297

(например, сложных, гибридных и высокоманнозных структур), измеренных с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF, как описано в WO 2008/077546, например, Asn297 относится к остатку аспарагина, расположенному примерно в положении 297 в Fc-области (Еи нумерация остатков в Fc-области); однако Asn297 также может быть расположен на примерно ±3 аминокислоты выше или ниже от положения 297, т.е. между положениями 294 и 300, из-за незначительных изменений последовательности антител. В некоторых вариантах по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела не являются фукозилированными.

[0160] В одном из вариантов осуществления антитело изменяют для улучшения его периода полувыведения из сыворотки. Чтобы увеличить период полувыведения антитела из сыворотки, в антитело (особенно фрагмент антитела) можно включить эпитоп, связывающий рецептор спасения, как описано, например, в патенте США № 5739277. Используемый в настоящем описании термин «эпитоп, связывающий рецептор спасения» относится к эпитопу Fc-области молекулы IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), который отвечает за увеличение периода полувыведения молекулы IgG из сыворотки *in vivo* (заявка на патент США № 5624821; патент США № 6821505; патент США № 6166545; патент США № 5634597).

[0161] Другим типом варианта является вариант аминокислотной замены. Эти варианты имеют по меньшей мере один аминокислотный остаток в молекуле антитела, замененный другим остатком. Участки, представляющие интерес для заместительного мутагенеза, включают гипервариабельные области, но также рассматриваются замены в FR. Консервативные замены показаны в таблице 5 под заголовком «предпочтительные замены». Если такие замены приводят к желаемому изменению биологической активности, то могут быть введены более существенные замены, обозначенные «примерами замен» в таблице 5 или как описано ниже в отношении классов аминокислот, а продукты подвергнуты скринингу.

Таблица 5

Исходные остатки	Примеры замен	Предпочтительные замены
	<u> </u>	
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Asp, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn, Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg

Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин	Leu
Leu (L)	норлейцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Trp, Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val, Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, норлейцин	Leu

- [0162] Существенные модификации в биологических свойствах антитела достигаются путем выбора замен, которые значительно различаются по своему воздействию на сохранение: (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, в виде листовой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом участке, или с) объема боковой цепи. Аминокислоты могут быть сгруппированы по сходству свойств их боковых цепей (A.L. Lehninger, Biochemistiy, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):
 - (1) неполярные: Ala (A), Val (V), Leu (L), He (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) незаряженные, полярные: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gin (Q)
 - (3) кислотные: Asp (D), Glu (E)
 - (4) щелочные: Lys (K), Arg (R), His (H)
- [0163] Альтернативно, встречающиеся в природе остатки могут быть разделены на группы на основе общих свойств боковой цепи:
 - (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, He;
 - (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gin;
 - (3) кислотные: Asp, Glu;
 - (4) щелочные: His, Lys, Arg;
 - (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro;
 - (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.
- [0164] Неконсервативные замены повлекут за собой замену члена одного из этих классов членом другого класса. Такие замещенные остатки также могут быть введены в консервативные участки замещения или в оставшиеся (неконсервативные) участки.
- [0165] Один тип заместительного варианта включает замену одного или более остатков гипервариабельной области родительского антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). Обычно полученный вариант(ы), выбранный для дальнейшей разработки, будет иметь модифицированные (например,

улучшенные) биологические свойства по сравнению с родительским антителом, из которого они получены. Удобный способ генерирования таких заместительных вариантов включает созревание сродства с использованием фагового дисплея. Вкратце, несколько участков гипервариабельной области (например, 6-7 участков) подвергают мутации для генерации всех возможных аминокислотных замен в каждом участке. Полученные таким образом антитела воспроизводят из частиц нитчатого фага в виде слияний, по меньшей мере, с частью белка оболочки фага (например, продукта гена III M13), упакованного внутри каждой частицы. Затем отображенные с помощью фага варианты подвергают скринингу относительно их биологической активности (например, сродства связывания). Для идентификации участков гипервариабельной области, которые являются кандидатами для модификации, может быть выполнен сканирующий мутагенез (например, аланиновое сканирование), чтобы идентифицировать остатки гипервариабельной области, вносящие значительный вклад в связывание антигена. Альтернативно или дополнительно, полезно проанализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело, чтобы идентифицировать точки контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами на замещение в соответствии с методами, известными в данной области техники, включая методы, разработанные в настоящем изобретении. После создания таких вариантов панель вариантов подвергают скринингу с помощью методов, известных в данной области, включая методы, описанные в настоящей заявке, что позволит по результатам одного или более соответствующих анализов выбрать антитела с превосходными свойствами для дальнейшей разработки.

[0166] Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотной последовательности антитела, получают различными способами, известными в данной области. Эти способы включают, без ограничения, выделение из природного источника (в случае встречающихся в природе вариантов аминокислотной последовательности) или получение с помощью олигонуклеотид-опосредованного (или сайт-направленного) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее приготовленного варианта или невариантной версии антитела.

[0167] Может потребоваться ввести одну или более модификаций аминокислот в Fc-области антител по настоящему изобретению, тем самым генерируя вариант Fc-области. Вариант Fc-области может содержать последовательность человеческой Fc-области (например, Fc-область человеческого IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), содержащую аминокислотную модификацию (например, замену) в одном или более аминокислотных положениях, в том числе цистеина шарнирной области. В некоторых вариантах осуществления вариант Fc-области содержит Fc-область человеческого IgG4. В дополнительном варианте осуществления Fc-область человеческого IgG4 содержит аминокислотную замену S228P, причем аминокислотные остатки пронумерованы в соответствии с индексом EU, как в Кабат.

[0168] В соответствии с настоящим описанием и информацией из уровня техники предполагается, что в некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему

изобретению может содержать одно или более изменений по сравнению с аналогичным антителом дикого типа, например, в Fc-области. Тем не менее, эти антитела, по существу, сохраняют такие же необходимые для терапевтического применения характеристики, что и их аналоги дикого типа. Например, предполагается, что в Fc-области могут быть сделаны некоторые изменения, которые привели бы к измененному (т.е. либо улучшенному, либо уменьшенному) связыванию C1q и/или комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), например, как описано в WO 99/51642. См. также Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); Патент США № 5648260; Патент США № 5624821; и WO 94/29351, в которых описаны другие примеры вариантов Fc-области. В WO 00/42072 (Presta) и WO 2004/056312 (Lowman) описаны варианты антител, демонстрирующие улучшенное или уменьшенное связывание FcR. Содержание этих патентных публикаций специально включено в настоящее описание в виде ссылки. См. также Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001). Антитела с увеличенным периодом полувыведения и улучшенным связыванием с неонатальным Fcрецептором (FcRn), ответственным за перенос материнских IgG к плоду (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) и Kim et al. J. Immunol. 24:249 (1994)), описаны в US 2005/0014934A1 (Hinton et al.). Эти антитела содержат Fc-область с одной или более заменами, которые улучшают связывание Fc-области с FcRn. Варианты полипептида с измененными аминокислотными последовательностями Fc-области и повышенной или пониженной способностью связывать C1q описаны в патенте США № 6194515161, WO99/51642. Содержание этих патентных публикаций специально включено в настоящее описание в виде ссылки. См. также Idusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184 (2000).

7. Векторы. Клетки-хозяева и рекомбинантные способы

Для рекомбинантного продуцирования антитела ПО настоящему изобретению выделяют кодирующую это антитело нуклеиновую кислоту, которую встраивают в реплицируемый вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или экспрессии. ДНК, кодирующую антитело, можно легко выделить и секвенировать cпомощью традиционных процедур (например, олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антитела). Доступны многие векторы. Выбор вектора частично зависит от используемой клетки-хозяина. Обычно клетки-хозяева являются либо прокариотическими, либо эукариотическими (обычно млекопитающих). Понятно, что для этой цели можно использовать константные области любого изотипа, включая константные области IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, и что такие константные области могут быть получены из человека или животного любого вида.

Генерация антител с помощью прокариотических клеток-хозяев:

а) Конструирование вектора

[0170] Полинуклеотидные последовательности, кодирующие полипептидные компоненты антитела по настоящему изобретению, могут быть получены с помощью стандартных рекомбинантных методов. Нужные полинуклеотидные последовательности могут быть выделены и секвенированы из продуцирующих антитело клеток, таких как

клетки гибридомы. Альтернативно, полинуклеотиды могут быть подвергнуты анализу методами синтеза нуклеотидов или ПЦР. После получения последовательности, кодирующие полипептиды, встраивают в рекомбинантный вектор, реплицироваться и экспрессировать гетерологичные полинуклеотиды в прокариотных хозяевах. Для целей настоящего изобретения можно использовать многие векторы, которые доступны и известны в данной области техники. Выбор подходящего вектора будет зависеть главным образом от размера нуклеиновых кислот, вставленных в вектор, и конкретной клетки-хозяина, которая должна быть трансформирована с помощью этого вектора. Каждый вектор содержит различные компоненты в зависимости от его функции (амплификации или экспрессии гетерологичного полинуклеотида или обоих) и его совместимости с конкретной клеткой-хозяином, в которой он находится. Компоненты вектора обычно включают, без ограничения: точку начала репликации, ген-маркер для селекции, промотор, сайт связывания рибосомы (RBS), сигнальную последовательность, вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты и последовательность терминации транскрипции.

[0171] Обычно, плазмидные векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, которые получены из видов, совместимых с клеткой-хозяином, используются вместе с этими хозяевами. Вектор обычно содержит сайт репликации, а также последовательности-маркеры, которые способны обеспечить фенотипический отбор в трансформированных клетках. Например, *E.coli* обычно трансформируют, используя плазмиду рВR322, полученную из вида *E. coli*. рВR322 содержит гены, кодирующие устойчивость к ампициллину (Атр) и тетрациклину (Теt), таким образом, обеспечивая простые средства для идентификации трансформированных клеток. рВR322, его производные или другие плазмиды микробов или бактериофагов также могут содержать или могут быть модифицированы таким образом, чтобы они содержали промоторы, которые могут использоваться микроорганизмом для экспрессии эндогенных белков. Примеры производных рВR322, используемых для экспрессии конкретных антител, подробно описаны в Carter et al., патент США № 5648237.

[0172] Кроме того, фаговые векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, совместимые с микроорганизмом-хозяином, можно использовать в качестве трансформирующих векторов по отношению к этим хозяевам. Например, для создания рекомбинантного вектора, который можно использовать для трансформации чувствительных клеток-хозяев, таких как E.coli LE392, можно использовать бактериофаг, такой как λ GEM-11.

[0173] Вектор экспрессии по настоящему изобретению может содержать две или более пары промотор-цистрон, кодирующие каждый из полипептидных компонентов. Промотор представляет собой нетранслируемую регуляторную последовательность, расположенную выше (5') по отношению к цистрону, которая модулирует его экспрессию. Прокариотические промоторы обычно делятся на два класса, индуцибельные и конститутивные. Индуцибельный промотор представляет собой промотор, который

инициирует повышенные уровни транскрипции цистрона под своим контролем в ответ на изменения условий культивирования, например наличие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры.

[0174] Хорошо известно большое количество промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами. Выбранный промотор может быть функционально связан с цистронной ДНК, кодирующей легкую или тяжелую цепь, путем удаления промотора из исходной ДНК в результате расщепления рестриктазой и вставки выделенной промоторной последовательности в вектор по настоящему изобретению. Как нативная промоторная последовательность, так и многие гетерологичные промоторы могут быть использованы для прямой амплификации и/или экспрессии целевых генов. В некоторых вариантах осуществления используются гетерологичные промоторы, поскольку, как правило, они обеспечивают высокий уровень транскрипции и более высокий выход экспрессируемого целевого гена по сравнению с нативным полипептидным целевым промотором.

[0175] Промоторы, подходящие для использования с прокариотическими хозяевами, включают промотор PhoA, β-галактамазную и лактозную промоторные системы, триптофановую (trp) промоторную систему и гибридные промоторы, такие как промотор tac или trc. Однако подходящими также являются и другие промоторы, которые функционируют в бактериях (например, другие известные бактериальные или фаговые промоторы). Их нуклеотидные последовательности были опубликованы, что позволяет квалифицированному специалисту выполнить функциональное лигирование этих промоторов с цистронами, кодирующими целевую легкую и тяжелую цепи (Siebenlist et al. (1980) Cell 20:269), используя линкеры или адаптеры для обеспечения любых необходимых сайтов рестрикции.

[0176] В одном из аспектов настоящего изобретения каждый цистрон в рекомбинантном векторе содержит секреторную сигнальную последовательность, которая направляет транслокацию экспрессированных полипептидов через мембрану. Как правило, сигнальная последовательность может быть компонентом вектора или может быть частью целевого ДНК-полипептида, встроенного в вектор. Сигнальная последовательность, выбранная для целей настоящего изобретения, должна быть узнаваемой и процессируемой (т.е. расщепляемой сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют сигнальные последовательности, присущие гетерологичным полипептидам, сигнальную последовательность заменяют прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы, состоящей ИЗ щелочной фосфатазы, пенициллиназы, Ipp ИЛИ лидерных последовательностей термостабильного энтеротоксина II (STII), LamB, PhoE, PeIB, ОтрА и МВР. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения сигнальные последовательности, используемые в обоих цистронах системы экспрессии, представляют собой сигнальные последовательности STII или их варианты.

[0177] В другом аспекте продуцирование иммуноглобулинов в соответствии с

настоящим изобретением может происходить в цитоплазме клетки-хозяина и, следовательно, не требовать наличия сигнальных последовательностей для секреции в каждом цистроне. В этом случае экспрессия, укладка и сборка легких и тяжелых цепей иммуноглобулина с образованием функциональных иммуноглобулинов происходит в цитоплазме. Некоторые штаммы-хозяева (например, штаммы trxB E.coil) обеспечивают условия в цитоплазме, которые являются благоприятными для образования дисульфидных связей, тем самым обеспечивая надлежащую укладку и сборку экспрессированных белковых субъединиц. Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

[0178] Антитела по настоящему изобретению также могут быть получены с помощью системы экспрессии, в которой количественное соотношение экспрессируемых полипептидных компонентов можно модулировать для получения максимального выхода секретируемых и правильно собранных антител по настоящему изобретению. Такая модуляция достигается, по меньшей мере, отчасти путем одновременной модуляции силы трансляции полипептидных компонентов.

[0179] Один из методов модуляции силы трансляции раскрыт Simmons et al., в патенте США № 5840523. В этом документе используются варианты сайта инициации трансляции (TIR) внутри цистрона. Для этого сайта TIR может быть создан ряд вариантов аминокислотных последовательностей или последовательностей нуклеиновых кислот с диапазоном сил трансляции, обеспечивая тем самым удобное средство для получения нужного уровня экспрессии конкретной цепи путем подбора этого фактора. Варианты TIR могут быть получены с помощью хорошо известных методов мутагенеза, в результате которых происходит замена кодонов, которая может привести к изменению аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления замены в нуклеотидной последовательности являются молчащими. Замены в TIR могут включать, например, замены в количестве или расположении последовательностей Шайн-Дальгарно, а также замены в сигнальной последовательности. Одним из способов создания мутантных сигнальных последовательностей является создание «банка кодонов» в начале кодирующей которые не изменяют аминокислотную последовательность последовательности, сигнальной последовательности (т.е. замены являются молчащими). Это может быть достигнуто путем замены третьего нуклеотида в каждом кодоне, к тому же, некоторые аминокислоты, такие как лейцин, серин и аргинин, имеют различные нуклеотиды в первом и втором положениях, что добавляет сложность в создании банка. Этот метод мутагенеза подробно описан в Yansura et al. al., (1992) METHODS: A companion to methods in Enzymol. метод в Enzymol. 4:151-158.

[0180] В одном из вариантов осуществления создают набор векторов с диапазоном сил ТІR для каждого находящегося в нем цистрона. Этот ограниченный набор позволяет осуществить сравнение уровней экспрессии каждой цепи, а также выход нужных продуктов антител при различных комбинациях силы ТІR. Сила ТІR может быть определена путем количественного определения уровня экспрессии репортерного гена, как подробно описано Simmons et al. в патенте США № 5840523. По результатам

сравнения силы трансляции выбирают нужные отдельные TIR, которые объединяют в экспрессирующие векторные конструкциях по настоящему изобретению.

[0181] Прокариотические клетки-хозяева, подходящие для экспрессии антител по изобретению, включают Archaebacteria и Eubacteria, настоящему такие грамотрицательные или грамположительные организмы. Примеры пригодных бактерий включают Escherichia (например, E.coli), Bacilli (например, B.subtilis), энтеробактерии, виды Pseudomoiias (например, P.aeruginosa), Salmonella typhimurium, Serratia marcescans, Klebsiella, Proteus, Shigella, Rhizobia, Vitreoscilla или Paracoccus. В одном из вариантов осуществления используются грамотрицательные клетки. В одном из вариантов осуществления в качестве хозяев по настоящему изобретению используются клетки *E.coli*. Примеры штаммов E.coli включают штамм W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, DC: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; депозит в ATCC № 27325) и его производные, включая штамм 33D3, имеющий генотип W3110 ΔfhuA (ΔtonA) ptr3 lac Iq lacL8 AompT∆(nmpc-fepE) degP41 kanR (патент США № 5639635). Другие штаммы и их производные, такие как 294 E.coli (ATCC 31446), E.coli B, E.coli 1776 (ATCC 31537) и RV308 E.coli (ATCC 31608), также являются подходящими. Эти примеры являются скорее иллюстративными, чем ограничивающими. Способы конструирования производных любой из вышеупомянутых бактерий, определенные генотипы, известны в данной области и описаны, например, Bass et al. Proteins, 8:309-314 (1990). Как правило, необходимо выбрать подходящие бактерии, принимая во внимание способность репликона к репликации в бактериальных клетках. Например, виды E.coli, Serratia или Salmonella могут подходить в качестве хозяина, когда для доставки репликона используются хорошо известные плазмиды, такие как pBR322, pBR325, pACYC177 или pKN410. Обычно требуется, чтобы клетка-хозяин секретировала минимальные количества протеолитических ферментов, и желательно, чтобы в клеточную культуру были включены дополнительные ингибиторы протеаз.

b) Получение антител

[0182] Клетки-хозяева трансформируют описанными выше векторами экспрессии и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных таким образом, чтобы они подходили для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих нужные последовательности.

[0183] Трансформация означает введение ДНК в прокариотического хозяина, таким образом, чтобы ДНК была реплицируемой либо в виде внехромосомного элемента, либо в виде части хромосомы. В зависимости от используемой клетки-хозяина, трансформацию выполняют с помощью стандартных методов, подходящих для таких клеток. Обработка кальцием с использованием хлорида кальция обычно используется для бактериальных клеток, которые имеют прочные барьеры в виде клеточной стенки. В другом методе трансформации используется полиэтиленгликоль/ДМСО. Еще одним используемым методом является электропорация.

[0184] Прокариотические клетки, используемые для получения полипептидов по

настоящему изобретению, выращивают в средах, известных в данной области техники и подходящих для культивирования выбранных клеток-хозяев. Примеры подходящих сред включают бульон Лурия (LB) плюс необходимые питательные добавки. В некоторых вариантах осуществления носитель также содержит селективный агент, выбранный на основе конструкции вектора экспрессии, для обеспечения селективного роста прокариотических клеток, содержащих вектор экспрессии. Например, ампициллин добавляют в среду для роста клеток, экспрессирующих ген устойчивости к ампициллину.

[0185] Любые необходимые добавки, помимо источников углерода, азота и неорганического фосфата, также могут быть включены в соответствующих концентрациях, и могут вводиться отдельно или в виде смеси с другой добавкой или средой, такой как комплексный источник азота. Необязательно культуральная среда может содержать один или более восстанавливающих агентов, выбранных из группы, состоящей из глутатиона, цистеина, цистамина, тиогликоллата, дитиоэритрита и дитиотреитола.

[0186] Прокариотические клетки-хозяева культивируют при подходящих температурах. В некоторых вариантах осуществления для роста *E.coli* температура находится в пределах от примерно 20°C до примерно 39°C; от примерно 25°C до примерно 37°C; или составляет примерно 30°C. рН среды может принимать любое значение в диапазоне от примерно 5 до примерно 9, в зависимости, главным образом, от организма-хозяина. В некоторых вариантах осуществления рН для *E.coli* составляет от примерно 6,8 до примерно 7,4 или примерно 7,0.

[0187] Если в векторе экспрессии по настоящему изобретению используется индуцибельный промотор, экспрессия белка индуцируется в условиях, подходящих для активации этого промотора. В одном из аспектов настоящего изобретения для контроля транскрипции полипептидов используются промоторы PhoA. Соответственно, трансформированные клетки-хозяева культивируют для индукции в среде с ограниченным количеством фосфата. В некоторых вариантах осуществления изобретения средой с ограниченным количеством фосфата является среда С.R.А.Р. (см., например, Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147). В соответствии с используемой векторной конструкцией можно использовать множество других индукторов, известных в данной области.

[0188] В одном из вариантов осуществления экспрессированные полипептиды по настоящему изобретению секретируют и извлекают из периплазмы клеток-хозяев. Извлечение белка обычно включает разрушение микроорганизма, как правило, такими средствами, как осмотический шок, обработка ультразвуком или лизис. После разрушения клетки клеточный дебрис или цельные клетки могут быть удалены путем центрифугирования или фильтрации. Белки могут быть дополнительно очищены, например, с помощью аффинной хроматографии на смоле. Альтернативно, белки могут быть транспортированы в культуральную среду и выделен из нее. Клетки могут быть удалены из культуры, а культуральный супернатант отфильтрован и сконцентрирован для

дальнейшей очистки полученных белков. Экспрессированные полипептиды могут быть дополнительно выделены и идентифицированы с помощью общеизвестных способов, таких как электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE) и Вестерн-блот анализ.

[0189] В одном из аспектов настоящего изобретения антитела получают в большом количестве с помощью ферментационного процесса. Для получения рекомбинантных белков доступны различные крупномасштабные ферментационные процессы с периодической подпиткой. Крупномасштабные ферментационные процессы можно осуществлять в емкостях, по меньшей мере, 1000 литров, а в некоторых вариантах от 1000 до 100000 литров. В таких ферментерах используются лопастные мешалки для распределения кислорода и питательных веществ, особенно глюкозы. Мелкомасштабные ферментационные процессы обычно выполняют в ферментерах, объемная емкость которых составляет не более примерно 100 литров, и может варьировать от примерно 1 литра до примерно 100 литров.

[0190] В ферментационном процессе экспрессию белка обычно инициируют после достижения нужной плотности в процессе выращивания клеток в подходящих условиях, например значения OD550 примерно 180-220, при котором клетки находятся в ранней стационарной фазе. Множество индукторов, известных в данной области и описанных выше можно использовать в зависимости от используемой векторной конструкции. До индукции клетки могут выращиваться в течение более коротких периодов времени. Клетки обычно индуцируют в течение примерно 12-50 часов, хотя можно использовать более длительное или более короткое время индукции.

[0191] Для улучшения выхода и качества полипептидов по настоящему изобретению различные условия ферментации могут быть модифицированы. Например, для улучшения правильной сборки и укладки секретируемых полипептидов антител, можно использовать дополнительные векторы, сверхэкспрессирующие белки-шапероны, такие как белки Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD и или DsbG) или FkpA (цистранс-изомераза шаперона) пептидилпролил, c активностью для совместной трансформации прокариотических клеток-хозяина. Было показано, что белки-шапероны способствуют правильной укладке и нужной растворимости гетерологичных белков, продуцируемых в бактериальных клетках-хозяевах. Chen et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:19601-19605; Georgiou et al., патент США № 6083715; Georgiou et al., патент США № 6027888; Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105: Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

[0192] Для минимизации протеолиза экспрессированных гетерологичных белков (особенно белков, чувствительных к протеолизу), в настоящем изобретении могут быть использованы определенные штаммы-хозяева, дефицитные по протеолитическим ферментам. Например, штаммы клеток-хозяев могут быть модифицированы для введения генетической мутации(ий) в гены, кодирующие известные бактериальные протеазы, такие как протеаза III, QrnpT, DegP, Tsp, протеаза I, протеаза Мі, протеаза V, протеаза VI и их

комбинации. Некоторые штаммы E.coli с дефицитом протеаз доступны и описаны, например, Joly et al. (1998), см. выше; Georgiou et al., патент США № 5264365; Georgiou et al., патент США № 5508192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

[0193] В одном из вариантов осуществления в качестве клеток-хозяев в системе экспрессии по настоящему изобретению используют штаммы *E.coli*, дефицитные по протеолитическим ферментам и трансформированные плазмидами, сверхэкспрессирующими один или более белков-шаперонов.

с) Очистка антител.

[0194] В одном из вариантов осуществления антитело, полученное по настоящему изобретению, дополнительно очищают для получения препаратов, которые являются по существу гомогенными, для дальнейших анализов и применений. Могут быть использованы стандартные способы очистки белка, известные в данной области. Следующие процедуры являются примерами подходящих процедур очистки: фракционирование на иммуноаффинных или ионообменных колонках, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на диоксиде кремния или на катионообменной смоле, такой как DEAE, хроматофокусирование, SDS-PAGE, осаждение сульфатом аммония, и гель-фильтрация с использованием, например, Sephadex G-75.

[0195] В одном из аспектов для иммуноаффинной очистки продуктов антител по настоящему изобретению используется белок А, иммобилизованный на твердой фазе. Белок А представляет собой клеточный белок размером 41 кДа из *Staphylococcus aureas*, который связывается с высоким сродством с Fc-областью антител. Lindmark et al. (1983) J. Immunol. Мет. 62:1-13. Твердая фаза, на которую иммобилизован белок А, может представлять собой колонку со стеклянным носителем или носителем из диоксида кремния или колонку со стеклянным носителем с контролируемыми порами или колонку с носителем из кремниевой кислоты. В некоторых применениях колонка покрыта реагентом, таким как глицерин для предотвращения неспецифического связывания с загрязняющими веществами.

[0196] В качестве первой стадии очистки полученный из культуры клеток препарат, как описано выше, можно наносить на твердую фазу с иммобилизованным белком А для обеспечения специфического связывания представляющего интерес антитела с белком А. Затем твердую фазу промывают для удаления загрязнений, не имеющих специфического связывания с твердой фазой. Наконец, представляющее интерес антитело выделяют из твердой фазы элюированием.

Генерация антител с помощью эукариотических клеток-хозяев:

[0197] Вектор для использования в эукариотической клетке-хозяине обычно включает, без ограничения, один или более из следующих компонентов: сигнальную последовательность, точку начала репликации, один или более генов-маркеров, энхансерный элемент, промотор и последовательность терминации транскрипции.

а) Сигнальная последовательность

[0198] Вектор для применения в эукариотической клетке-хозяине также может

содержать сигнальную последовательность или другой полипептид, имеющий специфический сайт расщепления на N-конце представляющего интерес зрелого белка или полипептида. Выбранной гетерологичной сигнальной последовательностью может быть последовательность, которая является узнаваемой и процессируемой (т.е. которая расщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. При экспрессии клеток млекопитающих можно использовать сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например, gD-сигнал простого герпеса. ДНК для такой области-предшественника лигируют с кодирующей антитело ДНК с сохранением рамки считывания.

b) Точка начала репликации

[0199] Обычно для векторов экспрессии млекопитающих точка начала репликации не нужна. Например, как правило, может быть использована точка начала репликации SV40 только потому, что он содержит ранний промотор.

в) Селективный ген

[0200] Векторы экспрессии и клонирования могут содержать селективный ген, также называемый селективным маркером. Типичные селективные гены кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (b) восполняют питательные вещества, не синтезируемые ауксотрофами, где это актуально, или (c) поставляют необходимые питательные вещества, недоступные в сложных средах.

[0201] В одном из примеров схемы отбора используется лекарственное средство для остановки роста клетки-хозяина. Те клетки, которые успешно трансформированы гетерологичным геном, продуцируют белок, придающий устойчивость к лекарственному веществу, и, таким образом, выживают в режиме отбора. В примерах такой доминантной селекции используют такие лекарственные вещества, как неомицин, микофеноловая кислота и гигромицин.

[0202] Другим примером подходящих селективных маркеров для клеток млекопитающих являются маркеры, позволяющие идентифицировать клетки, способные поглощать кодирующую антитело нуклеиновую кислоту, такую как DHFR, тимидинкиназа, металлотионеин-I и -II, металлотионеиновые гены приматов, аденозиндеаминаза, орнитин декарбоксилаза и др.

[0203] В некоторых вариантах осуществления, например, клетки, трансформированные селекционным геном DHFR, сначала идентифицируют путем культивирования всех трансформантов в культуральной среде, которая содержит конкурентный антагонист DHFR. метотрексат (Mtx), В некоторых осуществления подходящей клеткой-хозяином, когда используется DHFR дикого типа, является клеточная линия яичника китайского хомячка (СНО), дефицитная по активности DHFR (например, ATCC CRL-9096).

[0204] Альтернативно, клетки-хозяева (в частности, хозяева дикого типа, которые содержат эндогенный DHFR), трансформированные или ко-трансформированные

последовательностями ДНК, кодирующими антитело, белок DHFR дикого типа и другой селективный маркер, такой как аминогликозид-3'-фосфотрансфераза (APH), могут быть отобраны путем выращивания клеток в среде, содержащей селективный агент для селективного маркера, такого как аминогликозидный антибиотик, например, канамицин, неомицин или G418. См. патент США № 4965199. Клетки-хозяева могут включать NS0, CHOK1, CHOKISV или их производные, включая клеточные линии, дефицитные по глютаминсинтетазе (GS). Способы использования GS в качестве селективного маркера для клеток млекопитающих описаны в патенте США № 5122464 и патенте США № 5891693.

d) Промоторный компонент.

[0205] Векторы для экспрессии и клонирования обычно содержат промотор, который является узнаваемым организмом-хозяином и функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей представляющий интерес полипептид (например, антитело). Промоторные последовательности известны для эукариот. Например, в действительности, все эукариотические гены имеют АТ-богатый участок, расположенный примерно на 25-30 оснований выше сайта начала транскрипции. Другая последовательность, обнаруженная у многих генов на 70-80 оснований выше от начала транскрипции, представляет собой область CNCAAT, где N может быть любым нуклеотидом. Ha 3'-конце большинства эукариотических находится генов последовательность ААТААА, которая может служить сигналом для добавления полиАхвоста 3'-концу кодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления любая из этих последовательностей может быть вставлена подходящим образом в эукариотические экспрессирующие векторы.

[0206] Транскрипция из векторов в клетках-хозяевах млекопитающих контролируется, например, промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы птиц, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и вирус обезьян 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например, актинового промотора или иммуноглобулинового промотора, из промоторов белков теплового шока, если такие промоторы являются совместимыми с системами клеток-хозяев.

[0207] Ранние и поздние промоторы вируса SV40 удобно получать в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит точку начала репликации вируса SV40. Немедленно-ранний промотор человеческого цитомегаловируса удобно получать в виде рестрикционного фрагмента HindIII Е. Система для экспрессии ДНК в клетках-хозяевах млекопитающих с использованием вируса бычьей папилломы в качестве вектора раскрыта в патенте США № 4419446. Модификация этой системы описана в патенте США № 4601978. См. также Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982), где описана экспрессия кДНК β-интерферона человека в мышиных клетках под контролем промотора тимидинкиназы из вируса простого герпеса. Альтернативно, в качестве промотора может

быть использован длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

е) Энхансерный компонент

[0208] Транскрипция ДНК, кодирующей антитело по настоящему изобретению высшими эукариотами, часто увеличивается в результате вставки в вектор энхансерной последовательности. Сегодня известно много энхансерных последовательностей, полученных из генов млекопитающих (глобина, эластазы, альбуминв, α-фетопротеина и инсулина). Однако, как правило, используется энхансер, получаемый из вируса эукариотических клеток. Примеры включают энхансер SV40 в «поздней» области от точки начала репликации (п.о. 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса человека, энхансер раннего промотора цитомегаловируса мыши, энхансер полиомы в «поздней» области от точки начала репликации и энхансеры аденовируса. См. также Yaniv, Nature 297:17-18 (1982), где описаны энхансерные элементы для активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть встроен в вектор в положении 5' или 3' относительно последовательности, кодирующей полипептид антитела, но обычно расположен на участке 5' от промотора.

f) Компонент терминации транскрипции

[0209] Векторы экспрессии, используемые в эукариотических клетках-хозяевах, также могут содержать последовательности, необходимые для терминации транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно получают из 5', а иногда и из 3', нетранслируемых областей эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые как полиаденилированные фрагменты в нетранслируемой части мРНК, кодирующей антитело. Одним из полезных компонентов терминации транскрипции является область полиаденилирования бычьего гормона роста. См. WO94/11026 и вектор экспрессии, раскрытый в нем.

г) Трансформация и отбор клеток-хозяев

[0210] Подходящие клетки-хозяева для клонирования или экспрессии ДНК в векторах по настоящему изобретению включают клетки высших эукариот, описанные в настоящей заявке. включая клетки-хозяева позвоночных. Размножение позвоночных в культуре (культуре ткани) стало рутинной процедурой. Примерами полезных линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия CV1 почки обезьяны, трансформированная SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия почки эмбриона человека (клетки 293 или 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen Virol. 36-59 (1997)); клетки почки новорожденного хомячка (ВНК, ATCC CCL 10); клетки яичников китайского хомячка, дефицитных по DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); клетки сертоли мыши (ТМ4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251. (1980)); клетки почки мартышки (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой обезьяны (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки цервикальной карциномы человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34), клетки печени буйвола (BRL 3A, ATCC CRL 1442), клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75), клетки печени человека (Hep G2, HB 8065), опухоль мышиной молочной железы

(MMT 060562, ATCC CCL51); клетки TRI (Mather et al. Annals NY Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); клетки MRC 5; клетки FS4; клетки CHOK1, клетки или производные CHOK1SV и линия гепатомы человека (Hep G2).

[0211] Клетки-хозяева трансформируют вышеописанными векторами экспрессии или клонирования для продуцирования антител и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих нужные последовательности.

h) Культивирование клеток-хозяев

[0212] Клетки-хозяева, используемые для получения антитела по настоящему изобретению, можно культивировать в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как Ham F10 (Sigma), минимальная питательная среда (Minimal Essential Medium ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma)) и модифицированная по способу Дульбекко среда Игла ((DMEM), Sigma), подходят для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, в качестве культуральной среды для клеток-хозяев можно использовать любую из сред, описанных в Ham et al, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al. Anal. Biochem. 102:255 (1980), патентах США № 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; или 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; или патенте США 30985. Любая из этих сред при необходимости может быть дополнена гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальция, магния и фосфата), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), GENTAMYCINTM), антибиотиками (такими как препарат микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие добавки, известные специалистам в данной области, также могут быть включены в соответствующих концентрациях. Условия культивирования, такие как температура, рН и т.п., соответствуют значениям, которые использовались ранее для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и являются очевидными для специалиста в данной области техники.

і) Очистка антитела.

рекомбинантных [0213] При использовании методов антитело может продуцироваться внутриклеточно или секретироваться непосредственно в среду. Если антитело продуцируется внутриклеточно, на первом этапе твердый дебрис либо клеткилибо лизированные фрагменты могут быть хозяева, удалены, например, центрифугированием или ультрафильтрацией. Когда антитело секретируется в среду, супернатанты из таких систем экспрессии могут быть сначала сконцентрированы с помощью коммерчески доступного фильтра для концентрации белка, например, с помощью ультрафильтрационной установки Amicon или Milhpore Pellicon. Ингибитор протеазы, такой как PMSF, может быть включен на любом из вышеуказанных этапов для ингибирования протеолиза, а для предотвращения роста случайных загрязнителей могут быть включены антибиотики.

[0214] Композиция антител, полученная из клеток, может быть очищена с помощью, например, гидроксилапатитовой хроматографии, гель-электрофореза, диализа и аффинной хроматографии, причем удобным методом является аффинная хроматография. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изотипа Fc-домена иммуноглобулина, который присутствует в антителе. Белок А может быть использован для очистки антител, основанных на человеческих $\gamma 1$, $\gamma 2$ или $\gamma 4$ тяжелых цепях (Lindmark et al., J. Immunol. Methods 62:1-13 (1983)). Белок G рекомендован для всех изотипов мышей и человеческого у3 (Guss et al., EMBO J. 5: 15671575 (1986)). Матрица, к которой присоединен аффинный лиганд, может быть агарозой, но могут быть использованы и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемыми порами или поли(стиролдивинил)бензол, обеспечивают более высокие скорости потока и более короткое время обработки, достигаемое в случае агарозы. Когда антитело содержит домен CH3, для очистки пригодна смола Bakerbond ABX^{TM} (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Другие методы очистки белков, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на силикагеле, хроматография с использованием гепарин-SEPHARQSETM, хроматография на анионноили катионообменной смоле (такой как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония также доступны в зависимости от извлекаемого антитела.

[0215] После любого этапа(ов) предварительной очистки смесь, содержащая представляющее интерес антитело и загрязняющие вещества, может быть подвергнута дальнейшей очистке, например, с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий при низком рН с использованием элюирующего буфера с рН примерно 2,5-4,5, которая проводится в условиях низкий концентраций солей (например, от 0 до 0,25 М соли).

[0216] В целом, в данной области техники хорошо известны различные методы для получения антител с целью их применения в исследованиях, испытаниях и в клинике, которые согласуются с вышеописанными методами и/или которые по мнению специалиста в данной области являются подходящими для конкретного представляющего интерес антитела.

Получение нефукозилированных антител.

[0217] Настоящее изобретение относится к способам получения антител с пониженной степенью фукозилирования. Например, способы, рассматриваемые в настоящем описании, включают, без ограничения, использование клеточных линий, дефицитных по фукозилированию белков (например, клетки Lee 13 CHO, клетки CHO, нокаутные по гену альфа-1,6-фукозилтрансферазы, клетки, сверхэкспрессирующие β1,4-N-ацетилглюкозамин-трансферазу III и также сверхэкспрессирующие фермент Гольджи γ-маннозидазу II и т.д.) и добавление аналога(ов) фукозы в среду для культивирования клеток, используемую для получения антител. См. Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); заявку на патент США № 2003/0157108 A1, Presta, L; WO 2004/056312 A1; Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004); и патент США № 8574907.

Дополнительные способы уменьшения содержания фукозы в антителах включают метод Glymaxx, описанный в публикации заявки на патент США № 2012/0214975. Дополнительные способы уменьшения содержания фукозы в антителах также включают добавление одного или более ингибиторов гликозидазы в среду для культивирования клеток, используемую для продуцирования антител. Ингибиторы гликозидазы включают α-глюкозидазу I, α-глюкозидазу II и α-маннозидазу I. В некоторых вариантах осуществления ингибитор гликозидазы представляет собой ингибитор α-маннозидазы I (например, кифунензин).

[0218] Используемый в настоящем описании термин «фукозилирование ядра» относится к добавлению фукозы («фукозилированию») к N-ацетилглюкозамину («GIcNAc») на восстанавливающем конце N-связанного гликана. Также предоставлены антитела, полученные такими способами, и их композиции.

[0219] В некоторых вариантах осуществления снижен уровень фукозилирования сложных N-гликозид-связанных сахарных цепей, связанных с Fc-областью (или доменом). Используемая в настоящем описании «сложная N-гликозид-связанная сахарная цепь» обычно связана с аспарагином 297 (согласно нумерации Кабат), тем не менее сложная N-гликозид-связанная сахарная цепь также может быть связана с другими остатками аспарагина. «Сложная N-гликозид-связанная сахарная цепь» исключает сахарную цепь с высоким содержанием маннозы, в которой невосстанавливающий конец ядерной структуры включает только маннозу, но включает 1) сложный тип, в котором невосстанавливающий конец ядерной структуры имеет одну или более ветвей галактозо-N-ацетилглюкозамина (также называемого «gal-GlcNAc»), и невосстанавливающий конец gal-GlcNAc также содержит сиаловую кислоту, биссекторный N-ацетилглюкозамин или т.п.; 2) гибридный тип, в котором невосстанавливающий конец ядерной структуры имеет как ветви N-гликозид-связанной сахарной цепи с высоким содержанием маннозы, так и сложную N-гликозид-связанную сахарную цепь.

[0220] В некоторых вариантах осуществления «сложная N-гликозид-связанная сахарная цепь» включает сложный тип, в котором невосстанавливающи конец ядерной структуры не имеет, имеет одну или более ветвей галактозо-N-ацетилглюкозамина (также называемого «gal-GlcNAc»), а невосстанавливающий конец Gal-GlcNAc необязательно дополнительно имеет структуру, такую как сиаловая кислота, биссекторный N-ацетилглюкозамин или т.п.

[0221] В соответствии со способами по изобретению обычно только незначительное количество фукозы включено в сложную N-гликозид-связанную сахарную цепь(и). Например, в различных вариантах осуществления менее примерно 60%, менее примерно 50%, менее примерно 40%, менее примерно 30%, менее примерно 20%, менее примерно 15%, менее примерно 10%, менее примерно 5% или менее примерно 1% антитела имеет фукозилированное фукозой ядро в композиции. В некоторых вариантах осуществления, по существу, ни одно (т.е. менее чем примерно 0,5%) антитело не имеет фукозилированное фукозой ядро в композиции. В некоторых вариантах осуществления

более примерно 40%, более примерно 50%, более примерно 60%, более примерно 70%, более примерно 80%, более примерно 90%, более примерно 91%, более примерно 92%, более примерно 93%, более примерно 94%, более примерно 95%, более примерно 96%, более примерно 97%, более примерно 98% или более примерно 99% антител в композиции являются нефукозилированными.

[0222] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу, в котором практически ни одна (т.е. менее чем примерно 0,5%) N-гликозидсвязанная углеводная цепь не содержит остатка фукозы. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлено антитело, в котором по меньшей мере одна или две тяжелые цепи антитела не являются фукозилированными.

[0223] Как описано выше, для экспрессии антитела могут быть использованы различные векторные системы экспрессии хозяина млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления питательная среда не содержит фукозы. В некоторых вариантах осуществления в культуральную среду добавляют эффективное количество аналога фукозы. В контексте настоящего изобретения «эффективное количество» относится к количеству аналога, которое является достаточным для уменьшения включения фукозы в сложную N-гликозид-связанную сахарную цепь антитела по меньшей мере на примерно 10%, по меньшей мере на примерно 20%, по меньшей мере на примерно 30%, по меньшей мере на примерно 50%. В некоторых вариантах осуществления антитела, продуцируемые способами по настоящему изобретению, включают по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 50% неядерного фукозилированного белка (например, не содержащего фукозилирование ядра) по сравнению с антителами, продуцируемыми из клеток-хозяев, культивируемых в отсутствие аналога фукозы.

[0224] Содержание (например, соотношение) сахарных цепей, в которых фукоза не связана с N-ацетилглюкозамином на восстанавливающем конце сахарной цепи, по сравнению с сахарными цепями, в которых фукоза связана с N-ацетилглюкозамином на восстановительном конце сахарной цепи, может быть определено, например, как описано в примерах. Другие методы включают гидразинолиз или расщепление ферментами (см., например, Biochemical Experimentation Methods 23: Method for Studying: Glycoprotein Sugar Chain (Japan Scientific Societies Press), под редакцией Reiko Takahashi (1989)), мечение флуоресцентной меткой или радиоизотопом высвобождаемой сахарной цепи и затем выделение меченой сахарной цепи с помощью хроматографии. Кроме того, составы высвобождаемых сахарных цепей могут быть определены с помощью анализа цепей методом НРАЕС-РАD (см., например, J. Liq Chromatogr. 6:1557 (1983)). (См. публикацию заявки на патент США № 2004/0110282).

III. Композиции

[0225] В некоторых аспектах настоящее изобретение также относится к композициям (например, фармацевтическим композициям), содержащим любое из

антител к сиглеку-8, представленных в настоящей заявке (например, антитело, которое связывается с сиглеком-8). В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к композиции, содержащей антитело к сиглеку-8, описанное в настоящей заявке, причем антитело содержит Fc-область и N-гликозид-связанные углеводные цепи, связанные с Fc-областью, при этом менее примерно 50% N-гликозид-связанных углеводных цепей содержат остаток фукозы. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит Fc-область и N-гликозид-связанные углеводные цепи, связанные с Fc-областью, причем менее примерно 45%, примерно 40%, примерно 35%, примерно 30%, примерно 25%, примерно 20% или примерно 15% N-гликозид-связанных углеводных цепей содержат остаток фукозы. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к композиции, содержащей антитело к сиглеку-8, описанное в настоящей заявке, причем антитело содержит Fc-область и N-гликозид-связанные углеводные цепи, связанные с Fc-областью, причем по существу ни одна из N-гликозид-связанных углеводных цепей не содержит остаток фукозы.

[0226] Терапевтические составы готовят для хранения путем смешивания ингредиента c требуемой степенью чистоты c необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wiklins, Pub., Gennaro Ed., Philadelphia, PA. 2000). Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают буферы, антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту, метионин, витамин Е, метабисульфит натрия; консерванты, агенты тоничности, стабилизаторы, комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); хелатообразующие агенты, такие как ЭДТА и/или неионные поверхностно-активные вещества.

[0227] Буферы могут быть использованы для контроля рН в диапазоне, который оптимизирует терапевтическую эффективность, особенно если стабильность зависит от рН. Буферы могут присутствовать в концентрациях от примерно 50 мМ до примерно 250 мМ. Подходящие буферные агенты для использования в настоящем изобретении включают как органические, так и неорганические кислоты и их соли, например, цитрат, фосфат, сукцинат, тартрат, фумарат, глюконат, оксалат, лактат, ацетат. Кроме того, буферы могут состоять из солей гистидина и триметиламина, таких как трис.

[0228] Для предотвращения роста микробов могут быть добавлены консерванты, которые обычно присутствуют в количестве от примерно 0,2% до 1,0% (мас./об.). Подходящие для использования по настоящему изобретению консерванты включают октадецилдиметилбензиламмоний хлорид; гексаметоний хлорид; галогениды бензалкония (например, хлорид, бромид, йодид), хлорид бензетония; тимеросал, фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол.

[0229] Могут присутствовать агенты тоничности, иногда известные как «стабилизаторы», для регулирования или поддержания тоничности жидкости в

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

[0230] Дополнительные наполнители включают агенты, которые могут служить в качестве одного или более из следующего: (1) наполнителей, (2) усилителей растворимости, (3) стабилизаторов и (4) и агентов, предотвращающих денатурацию или прилипание к стенке контейнера. Такие вспомогательные вещества включают: многоатомные сахарные спирты (перечисленные выше); аминокислоты, такие как аланин, глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин, лизин, орнитин, лейцин, 2-фенилаланин, глутаминовая кислота, треонин и т.д.; органические сахара или сахарные спирты, такие как сахароза, лактоза, лактит, трегалоза, стахиоз, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, рибит, миоинизитоз, миоинизит, галактоза, галактит, глицерин, циклитолы (например, инозит), полиэтиленгликоль, серосодержащие восстанавливающий агенты, такие как мочевина, глутатион, тиоктовая кислота, тиогликолат натрия, тиоглицерин, α-монотиоглицерин и тиосульфат натрия; низкомолекулярные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, бычий сывороточный альбумин, желатин или другие иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; моносахариды (например, ксилоза, манноза, фруктоза, глюкоза; дисахариды (например, лактоза, мальтоза, сахароза); трисахариды, такие как рафиноза; и полисахариды, такие как декстрин или декстран.

[0231] Могут присутствовать неионогенные поверхностно-активные вещества или детергенты (также известные как «смачивающие агенты») для облегчения растворения терапевтического агента, а также для защиты терапевтического белка от вызванной встряхиванием агрегации, подвергая при этом состав воздействию поверхностного напряжения сдвига, не вызывая денатурации активного терапевтического белка или антитела. Неионные поверхностно-активные вещества присутствуют в диапазоне от примерно 0,05 до примерно 1,0 мг/мл или от примерно 0,07 до примерно 0,2 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления неионогенные поверхностно-активные вещества присутствуют в диапазоне от примерно 0,001% до примерно 0,1% мас./об. или от примерно 0,01% до примерно 0,025% мас./об.

[0232] Подходящие неионные поверхностно-активные вещества включают полисорбаты (20, 40, 60, 65, 80 и т.д.), полоксамеры (184, 188 и т.д.), полиолы PLURONIC®, TRITON®, моноэфиры полиоксиэтиленсорбитана (TWEEN®-20, TWEEN®-80 и др.), лауромакрогол 400, полиоксил 40 стеарат, полиоксиэтилен гидрогенизированное

касторовое масло 10, 50 и 60, моностеарат глицерина, эфир сахарозы и жирных кислот, метилцеллюлозу и карбоксиметилцеллюлозу. Анионные детергенты, которые можно использовать, включают лаурилсульфат натрия, диоктилсульфосукцинат натрия и диоктилсульфонат натрия. Катионные детергенты включают бензалкония хлорид или бензетония хлорид.

[0233] Чтобы составы можно было использовать для введения *in vivo*, они должны быть стерильными. Составы можно сделать стерильными с помощью фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны. Терапевтические композиции по изобретению обычно помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например, мешок для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

[0234] Путь введения соответствует известным и принятым способам, таким как однократное или многократное болюсное введение или инфузия в течение длительного периода времени подходящим способом, например в виде инъекции или инфузии путем подкожного, внутривенного, внутрибрюшинного, внутримышечного, внутриартериального, внутриочагового или внутрисуставного, местного введения, путем ингаляции или в виде средства с замедленным или пролонгированным высвобождением.

[0235] Состав по настоящему изобретению также может содержать более одного активного соединения, необходимого для лечения конкретного показания, предпочтительно, с активностями, которые не оказывают вредного влияния друг на друга. Такие активные соединения присутствуют в подходящей комбинации в количествах, которые эффективны для предполагаемой цели.

IV. Изделия или наборы

[0236] В другом аспекте предложено изделие или набор, который содержит антитело к сиглеку-8, описанное в настоящей заявке (например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8). Изделие или набор может дополнительно содержать инструкции по применению антитела в способах по настоящему изобретению. Таким образом, в определенных вариантах осуществления изделие или набор содержит инструкции по применению антитела к сиглеку-8, которое связывается с человеческим сиглеком-8, в способах лечения и/или предотвращения аллергического заболевания глаз (например, аллергического конъюнктивита, кератоконъюнктивита или гигантского папиллярного конъюнктивита) у индивидуума, включающих введение индивидууму эффективного количества антитела к сиглеку-8, которое связывается с человеческим сиглеком-8. В некоторых вариантах осуществления изделие содержит лекарственное средство, содержащее антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8, и вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению лекарственного средства нуждающемуся в этом индивидууму для лечения и/или профилактики аллергического заболевания глаз (например, аллергического конъюнктивита, кератоконъюнктивита или гигантского папиллярного конъюнктивита). В некоторых вариантах осуществления во вкладыше в упаковку дополнительно указано, что лечение является эффективным для

уменьшения одного или более симптомов у индивидуума с аллергическим заболеванием глаз (например, аллергическим конъюнктивитом, кератоконъюнктивитом или гигантским папиллярным конъюнктивитом) по сравнению с исходным уровнем до введения лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления индивидууму поставлен диагноз аллергического заболевания глаз (например, аллергического конъюнктивита, кератоконъюнктивита или гигантского папиллярного конъюнктивита) до введения лекарственного средства, содержащего антитело. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой человека.

[0237] Изделие или набор могут дополнительно содержать контейнер. Подходящие контейнеры включают, например, бутыли, флаконы (например, двухкамерные флаконы), шприцы (такие как однокамерные или двухкамерные шприцы) и пробирки. Контейнер может быть изготовлен из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит состав.

[0238] Изделие или набор может дополнительно содержать этикетку или вкладыш в упаковку, который находится на контейнере или связан с контейнером, и может содержать указания о том, как восстанавливать и/или использовать препарат. Этикетка или вкладыш в упаковку могут дополнительно содержать указания о пользе состава или о его назначении для подкожного, внутривенного или других способов введения для лечения и/или профилактики аллергического заболевания глаз (например, аллергического коньюнктивита, кератоконьюнктивита или гигантского папиллярного коньюнктивита) у индивидуума. Контейнер, содержащий состав, может представлять собой флакон одноразового использования или флакон многоразового использования, который позволяет осуществлять повторные введения восстановленного состава. Изделие или набор может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий подходящий разбавитель. Изделие или набор может дополнительно включать другие материалы, необходимые с коммерческой, терапевтической и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по применению.

[0239] В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к набору для единичного введения дозы. Такие наборы содержат контейнер с водным составом терапевтического антитела, включающий как однокамерные, так и многокамерные предварительно заполненные шприцы. Типичные предварительно заполненные шприцы доступны от Vetter GmbH, Равенсбург, Германия.

[0240] В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к изделию или набору, содержащему составы, описанные в настоящей заявке, для введения в автоинжекторное устройство. Автоинжектор может быть описан как инъекционное устройство, которое после активации доставляет свое содержимое без дополнительных необходимых действий со стороны пациента или администратора. Они особенно подходят для самолечения с помощью терапевтических составов, когда скорость доставки должна быть постоянной, а время доставки превышает несколько мгновений.

[0241] В другом аспекте предложено изделие или набор, который содержит антитело к сиглеку-8, описанное в настоящем описании (например, антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8). Изделие или набор может дополнительно содержать инструкции по применению антитела в способах по настоящему изобретению. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изделие или набор содержит инструкции по применению антитела к сиглеку-8, которое связывается с человеческим сиглеком-8, в способах лечения или профилактики аллергического заболевания глаз (например, аллергического конъюнктивита, кератоконъюнктивита, или гигантский папиллярный конъюнктивит) у индивидуума, включающих введение индивидууму эффективного количества антитела к сиглеку-8, которое связывается с человеческим сиглеком-8. В некоторых вариантах осуществления изделие или набор содержит лекарственное средство, содержащее антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8, и вкладыш в упаковку, содержащий инструкции для введения лекарственного средства нуждающемуся в этом индивидууму для лечения и/или профилактики аллергического заболевания глаз (например, аллергического конъюнктивита, кератоконъюнктивита или гигантского папиллярного конъюнктивита).

[0242] Настоящее изобретение также отночится к изделию или набору, который содержит антитело к сиглеку-8, описанное в настоящей заявке (например, человеческое антитело, которое связывается с сиглеком-8) в комбинации с одним или более дополнительными лекарственными средствами (например, вторым лекарственным средством) для лечения или профилактики аллергического заболевания глаз (например, аллергического конъюнктивита, кератоконъюнктивита или гигантского папиллярного конъюнктивита) у индивидуума. Изделие или набор может дополнительно содержать инструкции по применению антитела в комбинации с одним или более дополнительными лекарственными средствами в способах по настоящему изобретению. Например, изделие или набор по изобретению необязательно дополнительно содержит контейнер, содержащий второе лекарственное средство, причем антитело к сиглеку-8 представляет собой первое лекарственное средство, при этом изделие или набор дополнительно содержит инструкции, представленные на этикетке или на вкладыше в упаковку, для лечения индивидуума с помощью второго лекарственного средства в эффективном количестве. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изделие или набор содержит инструкции по применению антитела к сиглеку-8, которое связывается с человеческим сиглеком-8, в комбинации с одним или более дополнительными лекарственными средствами в способах лечения или профилактики аллергического заболевания глаз (например, аллергического конъюнктивита, кератоконъюнктивита или гигантского папиллярного конъюнктивита) у человека. В некоторых вариантах осуществления изделие или набор содержит лекарственное средство, содержащее антитело, которое связывается с человеческим сиглеком-8 (например, первым лекарственным средством), одно или более дополнительных лекарственных средств и вкладыш в упаковку, содержащий инструкции по введению первого лекарственного средства в комбинации с одним или более дополнительных лекарственных средств (например, вторым лекарственным средством). В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных терапевтических агентов могут включать, без ограничения, кортикостероид (например, будесонид, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон или предизон), антигистамин (например, гидрохлорид левоабастина или олопататин), кетотифен азеластин, эпинастин, бепостатин, циклоспорин и нестероидное противовоспалительное средство (НПВС).

[0243] Очевидно, что аспекты и варианты осуществления, описанные в настоящей заявке, предназначены только с целью иллюстрации и что специалистам в данной области техники могут быть предложены различные модификации или изменения, не изменяющие сущность изобретения и входящие в сферу применения настоящей заявки и объем прилагаемой формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

[0244] Настоящее изобретение станет более понятым со ссылкой на приведенные ниже примеры. Однако приведенные ниже примеры не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения. Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящей заявке, предназначены исключительно для иллюстрации и что специалистам в данной области техники могут быть предложены различные модификации или изменения, не изменяющие сущность изобретения и входящие в сферу применения настоящей заявки и объем прилагаемой формулы изобретения.

Пример 1. Оценка антител к сиглеку-8 с использованием мышиной модели аллергического конъюнктивита *in vivo*.

[0245] Для изучения различных аллергических заболеваний глаз создавали животные модели (см., например, Groneberg, DA el al. (2003) Allergy 58:1101-1113), включая мышиную модель аллергического конъюнктивита (Giavina-Bianchi, P. elal. (2008) Ada Ophthalmol. 86:670-675). Для оценки действия антител к сиглеку-8 на мышиных моделях аллергического конъюнктивита мышей, трансгенных по гену сиглек-8, сенсибилизировали системным введением аллергена, а затем подвергали стимуляции глазным аллергеном с последующим выполнением клинической оценки конъюнктивита во временном интервале от 15 до 24 часов после заражения путем наблюдения ранней и поздней фазы воспалительных реакций.

[0246] Модель «Der p» у мышей C57B1/6, описанную Giavina-Bianchi, P. et al. (2008) Acta Opkthalmol. 86:670-675 получали следующим образом. Мышей иммунизировали растворами, приготовленными из экстрактов *D. pteronyssinus* («Der p») в день 0. Через 10 дней осуществляли провокационную глазную инъекцию, чтобы вызвать аллергический конъюнктивит.

[0247] Клинический анализ и сбор материала для лабораторных анализов выполняли через 20 минут и в течение 24 часов после провокационной глазной инъекции. В частности, мышам подкожно вводили раствор для иммунизации, содержащий 5-500 мкг

аллергена в основание обеих задних ног и в нижнюю часть живота.

[0248] Одну четвертую дозы вводили в каждую заднюю ногу, а оставшуюся половину вводили в брюшную полость. Через десять дней после сенсибилизации мышей заражали двумя каплями раствора аллергена (4-5 микрограмм/микролитр), вводимыми в каждый глаз. Через 20 минут и 24 часа после заражения мышей обследовали на отек конъюнктивы; отек глазного дна; гиперемии конъюнктивы и слезотечение. Ткани и выделения анализировали на наличие цитокинов и наличие воспалительных клеток, включая тучные клетки и эозинофилы. Для оценки активности антитела к сиглеку-8, указанное антитело или контрольный изотип вводили в дозе 0,1-5,0 мг/кг путем внутрибрюшинного введения за один или 3 дня до заражения глаз или вводили два раза в неделю с момента сенсибилизации.

[0249] Для индуцированного овальбумином конъюнктивита трансгенных по гену сиглек-8 мышей сенсибилизировали внутрибрюшинным введением 0,1 мг овальбумина с 1 мг адъюванта (гидроксид алюминия) и 0,3 мг коклюшного токсина с дополнительной подкожной инъекцией овальбумина на 4 день (50 мкг) и введением провокационной глазной инъекции, состоящей из 0,75 мг овальбумина, в день 17 в соответствии с методом, описанным Izushi, К. et al. (2002) Enr. J. Pharmacol. 440:79-82. Лечение антителами к сиглеку-8, клинические анализы и лабораторные анализы выполняли, как описано выше.

[0250] Для конъюнктивита, вызванного амброзией, трансгенных по гену сиглек-8 мышей сенсибилизировали путем подкожного введения 50 мкг экстракта амброзии и 5 мг гидроксида алюминия в день 0, и провокационную глазную инъекцию осуществляли с использованием 1,25 мг экстракта амброзии в день 9, как описано Магоне, МТ et al. (1998) Clin. Immunol. Immunopathol. 87(1):75-84. Лечение антителами к сиглеку-8, клинические анализы и лабораторные анализы выполняли, как описано выше.

Пример 2: Структура открытого пилотного исследования для оценки эффективности и безопасности лечения с помощью антител к сиглеку-8 пациентов с атопическим кератоконъюнктивитом (АКС), весенним кератоконъюнктивитом (VKC) и круглогодичным аллергическим конъюнктивитом (РАС)

[0251] В течение последних десятилетий количество людей с аллергическими заболеваниями глаз возросло, и предполагается, что в настоящее время этими заболеваниями страдают по меньшей мере 15-20% населения (La Rosa, M. et al. (2013) Ital, J. Pediatr. 39:18). Аллергические заболевания глаз охватывают ряд специфических клинических образований с различными механизмами действия. Настоящее исследование предназначено для проверки безопасности и эффективности лечения пациентов с АКС, VKC или PAC с помощью антителом к сиглеку-8.

[0252] В общей сложности приблизительно 30 пациентам вводят 6 доз антитела НЕКА к сиглеку-8 (нефукозилированного IgG1) в виде ежемесячной внутривенной инфузии), при этом доза составляет не более 3 мг/кг. Клинические лабораторные параметры и нежелательные явления оценивают с помощью общих терминологических критериев нежелательных явлений (СТСАЕ), версии 4.03. Регистрацию нежелательных

явлений начинают с момента первой инфузии тестируемого лекарственного вещества и заканчивают в день 309 (±7 дней) или во время визита врача в связи с ранним прекращением (ЕТ) лечения. Абсолютные показатели эозинофилов и базофилов в периферической крови измеряют, начиная в день -1 до введения дозы и заканчивая днем 309 или визитом ЕТ. Для оценки симптомов, связанных с АКС, VКС или РАС, используют анкету для выявления симптомов аллергического конъюнктивита (АСS), которая заполняется каждым субъектом ежедневно на протяжении всего периода исследования от момента скрининга до дня 309 или визита ЕТ.

[0253] Критерии включения включают:

- (а) возраст (>18 и <80 лет);
- (b) подтвержденный диагноз AKC, VKC или PAC и, по меньшей мере, один из следующих симптомов, причем средний балл симптомов \geq 3, рассчитанный по всем дневным опросникам ACS, заполненным во время периода скрининга (должно быть заполнено минимум 14 дневных опросников ACS):
 - 1. зуд
 - 2. светобоязнь
 - 3. боль в глазах
 - 4. ощущение инородного тела
 - 5. выделения из глаз
- (c) историю применения топических кортикостероидов и/или системных кортикостероидов для лечения аллергического конъюнктивита (AKC, VKC или PAC);
- (d) стабильную дозу(ы) разрешенных препаратов для лечения АКС, VКС или РАС в течение 14 дней до скрининга и в течение всего периода скрининга; и обязательство по сохранению приема такой же дозы(доз) препаратов АКС, VКС или РАС в течение всего периода участия в исследовании (если изменение дозы не связано с непредвиденной медицинской необходимостью):
 - (е) отрицательный результат скрининга на наличие яйцеклеток и паразитов; и
 - (f) отрицательный результат теста на беременность (для женщин).
 - [0253] Критерии исключения включают:
- (a) анамнез злокачественных новообразований, за исключением карциномы *in situ* в шейке матки, ранней стадии рака предстательной железы или немеланомного рака кожи;
- (b) использование контактных линз в течение 48 часов до введения первой дозы антитела;
- (c) участие в параллельном интервенционном исследовании с последним вмешательством, имевшим место в течение 30 дней до введения исследуемого лекарственного вещества (или 90 дней или 5 периодов полураспада, в зависимости от того, что дольше для биологических продуктов);
 - (d) лечение химиотерапией или лучевой терапией в предшествующие 6 месяцев;
- (e) лечение клинически значимой глистной паразитарной инфекции в течение 6 месяцев после скрининга;

- (f) использование в течение 30 дней до скрининга (или 5 периодов полураспада, в зависимости от того, что больше) или использование в течение периода скрининга топических противоотечных средств, топических вазоконстрикторов, топических ингибиторов кальциневрина, топических кортикостероидов, омализумаба, дупилумаба, системных иммунодепрессантов или системных кортикостероидов с суточной дозой >10 мг преднизона или эквивалентного препарата (допускается применение топических кортикостероидов для лечения атопического дерматита, кортикостероидных назальных спреев при рините и ингаляционных кортикостероидов при аллергической астме);
- (g) вакцинация живыми ослабленными вакцинами в течение 30 дней до начала лечения в исследовании, во время лечения, или вакцинация, ожидаемая в течение 5 периодов полувыведения (4 месяца) после введения исследуемого лекарственного средства;
- (h) положительные результаты серологического теста на гепатит при скрининге, за исключением вакцинированных пациентов или пациентов, перенесших гепатит; и
 - (і) положительные результаты серологического теста на ВИЧ при скрининге.
- [0255] Первичным критерием оценки является безопасность и переносимость лечения антителами, исходя из оценки клинических лабораторных параметров и нежелательных явлений, определенных с помощью общих терминологических критериев нежелательных явлений (СТСАЕ), версии 4.03,

[0256] Вторичные результаты включают:

- (a) изменения относительно исходного уровня в абсолютных показателях эозинофилов и базофилов в периферической крови (начиная со дня -1 до введения дозы до дня 309 или визита ET); и
- (b) изменения относительно исходных симптомов, связанных с АКС, VКС или РАС, которые измеряют ежедневно с помощью опросника, применяемого к пациенту с конкретным заболеванием, опросника по симптомам аллергического конъюнктивита (ACS) (на протяжении всего исследования, начиная с момента скрининга до дня 309 или визита ЕТ).

[0257] Дополнительные вторичные показатели включают:

- (а) изменения относительно исходного качества жизни, измеренные с помощью опросника-25 по функционированию зрительного анализатора Национального института глаз (NEI VFQ 25) (начиная со дня -1 до введения дозы до дня 309 или визита ET);
- (b) изменения относительно исходных показателей зрительного анализатора (включая точечное окрашивание роговицы) на цветной фотографии с щелевой лампой, определяемых централизованным центром считывания изображений (начиная со дня -1 до введения дозы до дня 309 или визита ЕТ);
- (c) изменения относительно результатов первичной офтальмологической оценки балла глазных симптомов, определенного исследователем или ассистентом (начиная со дня -1 до введения дозы до дня 309 или визита ET);
 - (d) изменения относительно исходной концентрации медиаторов воспаления и

концентрации антитела НЕКА к сиглеку-8 (нефукозилированного IgG1), измеренной в необязательно полученных образцах слезной жидкости (слеза) (начиная со дня -1 до введения дозы до дня 309 или визита ET);

- (е) изменения относительно исходных результатов гистопатологического исследования эозинофилов и тучных клеток в необязательно полученных образцах биопсии конъюнктивы (начиная со дня -1 до введения дозы до дня 309 или визита ЕТ);
- (f) изменения относительно исходных признаков и симптомов, измеряемых по баллам проявления симптомов, выставляемого ежедневно по опроснику для конкретного заболевания ACS, для 5 разных симптомов (начиная со дня -1 до введения дозы до дня 309 или визита ET);
- (g) изменения относительно исходных признаков и симптомов, измеряемых с помощью опросника по качеству жизни, опросника-25 по функционированию зрительного анализатора Национального института глаз (NEI VFQ 25); и
- (i) изменения относительно исходных признаков и симптомов, измеренных путем оценки сопутствующих атопических состояний (атопический дерматит, аллергическая астма, аллергический ринит).

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Все полипептидные последовательности представлены в направлении от N-конца к С-концу, если не указано иное. Все последовательности нуклеиновых кислот представлены в направлении от 5' к 3', если не указано иное,

Aминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи мышиного 2E2 QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTNY NSALMSRLSISKDNSKSQVFLKINSLQTDDTALYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTSVT VSS (SEQ ID NO:1)

Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи мышиного 2E2 RHA

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTN YNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTT VTVSS (SEQ ID NO:2)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи RHB</u> <u>мышиного 2E2</u>

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWLGVIWAGGSTN YNSALMSRLSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTT VTVSS (SEQ ID NO:3)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи RHC мышиного 2E2</u>

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTN YNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTT VTVSS (SEQ ID NO:4)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи RHD</u> мышиного 2E2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWLSVIWAGGSTN YNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTT VTVSS (SEQ ID NO:5)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи RHE</u> мышиного 2E2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:6)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи RHF</u> <u>мышиного 2E2</u>

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTN YNSALMSRLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTT VTVSS (SEQ ID NO:7)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи RHG</u> мышиного 2E2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTN YNSALMSRFSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTT VTVSS (SEQ ID NO:8)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи RHA2</u> мышиного 2E2

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISIYGAHWIRQPPGKGLEWIGVIWAGGSTNYN SALMSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTLVTV SS (SEQ ID NO:9)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи RHB2</u> мышиного 2E2

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTN YNSALMSRLSISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTL VTVSS (SEQ ID NO:10)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи RHE S-G</u> мышиного 2E2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYGMEYWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:11)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи RHE E-D</u> мышиного 2E2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMDYWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:12)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи RHE Y-V мышиного 2E2</u>

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEVWGQGT TVTVSS (SEQ ID NO:13)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи тройного мутанта RHE мышиного 2E2</u>

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYGMDVWGQG TTVTVSS (SEQ ID NO:14)

Aминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи мышиного 2E2 QIILTQSPAIMSASPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRF SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:15)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи RKA мышиного</u> 2E2

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:16)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи RKB мышиного</u> 2E2

EIILTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLWIYSTSNLASGVPARF SGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:17)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи RKC мышиного</u> 2E2

EIILTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARFS GSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:18)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи RKD мышиного</u> <u>2E2</u>

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLWIYSTSNLASGIPARF SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:19)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи RKE мышиного</u> 2E2

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGVPAR FSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:20)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи RKF мышиного</u> 2E2

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF SGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:21)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи RKG мышиного</u> 2E2

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:22)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи RKA F-Y</u> мышиного 2E2

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPYTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:23)

<u>Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи RKF F-Y</u> мышиного 2E2

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF SGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPYTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:24)

Aминокислотная последовательность тяжелой цепи HEKA и легкой цепи HEKF EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:75)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи НЕКА

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:76)

Аминокислотная последовательность легкой цепи НЕКГ

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF SGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:77)

AMUHOKUCJOTHAЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ КОНСТАНТНОЙ ОБЛАСТИ ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ IgG1
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:78)

Aминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи IgG4
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:79)

Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи каппа Ig RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:80)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи мышиных 2C4 и 2E2 IgG1

QVQLKRASGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTN YNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKINSLQTDDTALYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTSV TVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPA VLESDLYTLSSSVTVPSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSS VFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNST FRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMA KDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLNVQKSN WEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPG (SEQ ID NO:81)

Аминокислотная последовательность легкой цепи каппа мышиного 2C4
EIILTQSPAIMSASPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRF
SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKADAAPTVSIFPPSSEQ
LTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLT
KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO:82)

Аминокислотная последовательность легкой цепи каппа мышиного 2E2
QIILTQSPAIMSASPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRF
SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKADAAPTVSIFPPSSEQ
LTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLT
KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO:83)

Aминокислотная последовательность тяжелой цепи химерных 2C4 и 2E2 IgG1
QVQLKRASGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTN
YNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKINSLQTDDTALYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTSV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:84)

<u>Аминокислотная последовательность легкой цепи каппа химерного 2C4</u>
EIILTQSPAIMSASPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRF
SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:85)

Аминокислотная последовательность легкой цепи каппа химерного 2Е2

QIILTQSPAIMSASPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRF SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:86)

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:87)

Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи мышиного 1С3 (подчеркнутые остатки содержат CDR H1 и H2 согласно нумерации по Чотиа) EVQVVESGGDLVKSGGSLKLSCAASGFPFSSYAMSWVRQTPDKRLEWVAIISSGGSYTY YSDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHETAQAAWFAYWGQGTLV TVSA (SEQ ID NO:106)

Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи мышиного 1H10 (подчеркнутые остатки содержат CDR H1 и H2 согласно нумерации по Чотиа) EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDYYMYWVKQRPEQGLEWIGRIAPEDGDT EYAPKFQGKATVTADTSSNTAYLHLSSLTSEDTAVYYCTTEGNYYGSSILDYWGQGTT LTVSS (SEQ ID NO:107)

Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи мышиного 4F11 (подчеркнутые остатки содержат CDR H1 и H2 согласно нумерации по Чотиа) QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYAFRSSWMNWVKQRPGKGLEWIGQIYPGDDY TNYNGKFKGKVTLTADRSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARLGPYGPFADWGQGTLVT VSA (SEQ ID NO:108)

Aминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи мышиного 1С3 QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAYGVP ARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:109)

Aминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи мышиного 1H10 DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDITNYLNWYQQKPDGTVKLLIYFTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:110)

Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи мышиного 4F11 QIVLTQSPAIVSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQRPGSSPRLLIYDTSSLASGVPVR FSGSGSGTSYSLTISRIESEDAANYYCQQWNSDPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:111)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или профилактики гигантского папиллярного конъюнктивита у индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с человеческим Siglec-8.

По доверенности

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202391816

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C07K 16/00

СПК:

A61K 39/00 A61P 27/14

A61K 39/39 (2006.01) **A61P 27/00** (2006.01)

(2006.01)

C07K 16/00 A61K 2039/505

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК) C07К 16/00, A61К 39/39, A61Р 27/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины) Espacenet, EAPATIS, Google

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	WO 2015/089117 A1 (BEBBINGTON CHRISTOPHER R и др.) 2015.06.18, описание [007-0020], [0025], [0085-0120], [0226-0246], [0242-0247], реферат, формула	1
Y	TERRY CHIN, O.D. "GPC: DON'T CALL IT AN ALLERGIC REACTION". REVIEW OF OPTOMETRY LEADERSHIP IN CLINICAL CARE. Vol. No: 143:10Issue: 10/15/2006 весь документ	1
Y	HARVIMA IT и др. "MOLECULAR TARGETS ON MAST CELLS AND BASOPHILS FOR NOVEL THERAPIES". J ALLERGY CLIN IMMUNOL. 2014 Sep;134(3):530-44. doi: 10.1016/j.jaci.2014.03.007. Epub 2014 Apr 24. PMID: 24767877. c.535-537. 539	1

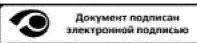
последующие документы указаны в продолжении

- * Особые категории ссылочных документов:
- «А» документ, определяющий общий уровень техники
- «D» документ, приведенный в евразийской заявке
- «E» более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
- «О» документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т. д
- "Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"
- «Т» более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
- «Х» документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
- «Y» документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
- «&» документ, являющийся патентом-аналогом
- «L» документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 31 октября 2023 (31.10.2023)

Уполномоченное лицо:

Начальник Управления экспертизы



Сертификат: 1683140433539 Владелец: СN=Аверкиев С. Действителен: 03.05.2023-02.05.2024 С.Е. Аверкиев