



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102027012 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 20

(21) 申请号 200880102546. 0

(22) 申请日 2008. 06. 18

(30) 优先权数据

60/945, 205 2007. 06. 20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 02. 09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/057731 2008. 06. 18

(87) PCT申请的公布数据

W02008/155365 EN 2008. 12. 24

(71) 申请人 IRM 责任有限公司

地址 美国哈密尔顿

(72) 发明人 董利群 M·纳索弗

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 31 页 附图 7 页

(54) 发明名称

用于治疗变应性疾病的方法和组合物

(57) 摘要

本发明中公开的是特异性识别并拮抗人 TSLP 受体的抗体, 和使用这些抗体治疗或改善 TSLP 信号转导介导的疾病或病症的方法。

1. 分离的抗体或其抗原结合部分，其包含 SEQ ID NO：7 或 SEQ.I.D.NO：21 的重链可变区序列。

2. 分离的抗体或其抗原结合部分，其包含 SEQ ID NO：7 的重链可变区序列和 SEQ ID NO：8 的轻链可变区序列或 SEQ ID NO：21 的重链可变区序列和 SEQ ID NO：22 的轻链可变区序列。

3. 权利要求 2 的抗体，其分别包含 SEQ.I.D.NO：1、2 和 3 或 SEQ.I.D.NO：15、16 和 17 的 CDRH1、H2 和 H3 或 SEQ.I.D.NO：4、5 和 6 或 SEQ.I.D.NO：18、19 和 20 的 CDRL1、L2 和 L3 序列。

4. 权利要求 2 的抗体，其分别包含 SEQ.I.D.NO：1、2 和 3 或 SEQ.I.D.NO：15、16 和 17 的 CDRH1、H2 和 H3 和 SEQ.I.D.NO：4、5 和 6 或 SEQ.I.D.NO：18、19 和 20 的 CDRL1、L2 和 L3 序列。

5. 权利要求 2 的抗体，其包含与 SEQ ID NO：7 有至少 80% 同一性的重链可变区氨基酸序列和与 SEQ ID NO：8 有至少 80% 同一性的轻链可变区氨基酸序列，或其包含与 SEQ ID NO：21 有至少 80% 同一性的重链可变区氨基酸序列和与 SEQ ID NO：22 有至少 80% 同一性的轻链可变区氨基酸序列。

6. 权利要求 2 的抗体，其为嵌合抗体。

7. 权利要求 1 或 2 的抗体，其包含人重链恒定区和人轻链恒定区。

8. 权利要求 2 的抗体，其为人源化抗体。

9. 权利要求 2 的抗体，其为人抗体。

10. 权利要求 2 的抗体，其为单链抗体。

11. 权利要求 2 的抗体，其为 Fab 片段。

12. 权利要求 2 的抗体，其为 IgG1 或 IgG4 同种型。

13. 分离的抗体，其包含 SEQ.I.D.NO：9 的重链和 SEQ.I.D.NO：10 的轻链。

14. 分离的多核苷酸或重组多核苷酸，其编码包含权利要求 2 到 13 任何一项的所述抗体的重链可变区或轻链可变区的多肽。

15. 权利要求 14 的多核苷酸，其中所述抗体是人抗体。

16. 权利要求 14 的多核苷酸，其中编码重链可变区的所述多核苷酸是 SEQ.I.D.NO：11 并且编码轻链可变区的所述多核苷酸是 SEQ.I.D.NO：12。

17. 分离的宿主细胞，其包含 (1) 编码权利要求 2 到 13 任何一项的抗体重链的重组 DNA 区段和 (2) 编码权利要求 2 到 13 任何一项的抗体轻链的第二个重组 DNA 区段；其中所述 DNA 区段分别有效连接第一个和第二个启动子，并能够在所述宿主细胞中表达。

18. 权利要求 17 的分离的宿主细胞，其中所述细胞是 CHO 或 NSO 细胞系。

19. 在受试者中治疗炎性疾病或病症的方法，所述方法包括向所述受试者施用包含有效量的权利要求 2 到 13 任何一项的抗体的药物组合物。

20. 权利要求 19 的方法，其中所述受试者是人。

21. 权利要求 19 或 20 的方法，其中所述受试者患有变应性炎性疾病。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述变应性炎性疾病是遗传过敏性皮炎、哮喘或变应性鼻炎。

23. 药物组合物，其包含权利要求 1 到 13 任何一项的抗体与药学上可接受的载体或赋

形剂，尤其用于权利要求 19 到 22 任何一项所述的方法。

24. 权利要求 23 的组合物，适用于皮下或静脉内施用。

用于治疗变应性疾病的方法和组合物

[0001] 发明背景

[0002] 细胞因子和免疫细胞介导特定的生理机制或途径，例如导致多种炎症疾病的途径。人胸腺间质淋巴细胞生成素 (TSLP) 是从人上皮细胞产生的 IL-7 样细胞因子。其促进 B 细胞分化，并也可共刺激胸腺细胞和成熟的 T 细胞。TSLP 结合人 CD11c+ 树状突细胞 (DC' s) 上特异的异二聚体受体。所述受体异二聚体由常见的 γ 样受体链 (TSLP 受体; TSLPR) 和 IL-7R- α 链组成。参阅例如 Tonozuka 等, Cytogenet.Cell Genet.93 : 23-25, 2001 ; Pandey 等, Nat.Immunol.1 : 59-64, 2000 ; L.S.Park 等, J.Exp.Med.192 : 659-670, 2000 ; 和 Reche 等, J.Immunol.167 : 336-343, 2001。结合受体的配体诱导 DC 分泌吸引 T_H2 的趋化因子、TARC (胸腺和活化调节的趋化因子) 和 MDC (巨噬细胞来源的细胞因子)。另外, TSLP 也诱导有效的 DC 激活、初生 CD4+T 细胞扩大, 并随后极化成 T_H2 表型, 产生促过敏细胞因子白介素 4 (IL-4)、IL-5、IL-13 和肿瘤坏死因子 α 。

[0003] 也发现 TSLP 信号转导导致 Stat5 转录因子的激活。此外, 已报道急性和慢性遗传过敏性皮炎患者在皮肤损伤中过表达 TSLP, 提示在体内 TSLP 表达与变应性炎症相关。除了皮肤角质形成细胞, 也已经在支气管上皮细胞、平滑肌和肺成纤维细胞中发现了高水平的 TSLP 表达, 也证明了 TSLP 在呼吸变应性适应症中的潜在作用。此外, IgE 激活的肥大细胞表达非常高水平的 TSLP, 这是参与维持 T_H2 表型的机制。

[0004] 在西方国家, 大约 20% 的人群患有炎症疾病, 例如变应性疾病, 其包括哮喘、鼻炎、遗传过敏性皮炎和食物过敏。50% 到 80% 患有遗传过敏性皮炎的患者患有或发生哮喘或变应性鼻炎。至今不能治愈变态反应诱导的哮喘、遗传过敏性皮炎和变应性鼻炎。目前的治疗, 如用于哮喘的 β -2 肾上腺素受体拮抗剂、用于遗传过敏性皮炎的 Elidel 和用于变应性鼻炎的 HI- 抗组胺剂是针对症状的。因此, 本领域对更好的疗法来治疗这些炎症疾病, 尤其是变应性炎症的需要提高。本发明解决了这一问题和其它问题。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明的实施方案在此处提供分离的人抗体或人源化抗体或其功能片段, 其具有对靶蛋白人胸腺间质淋巴细胞生成素受体 (hTSLPR) 特异的抗原结合区, 并且所述抗体或其功能片段结合 hTSLPR。在相关实施方案中, 至少通过细胞表面 hTSLP 受体结合测定与 hTSLPR 的结合, 防止炎症介体释放。

[0007] 在另一实施方案中, 本发明提供抗体或其功能片段的分离的抗原结合区。在某些实施方案中, 所述分离的抗原结合区包括具有 SEQ.I.D.NO : 1 中所示氨基酸序列的 CDRH1 区及其保守变体。如此处所述, 所述保守变体包括任何鉴定的氨基酸序列中的氨基酸残基。在相关实施方案中, 所述分离的抗原结合区是具有 SEQ.I.D.NO : 2 中所示氨基酸序列的 CDRH2 区及其保守变体。在另一相关实施方案中, 所述分离的抗原结合区是具有 SEQ.I.D.NO : 3 中所示氨基酸序列的 CDRH3 区及其保守变体。

[0008] 在另一实施方案中, 所述分离的抗原结合区是具有 SEQ.I.D NO : 4 中所示氨基酸序列的 CDRL1 区及其保守变体。在另一相关实施方案中, 所述分离的抗原结合区是具有 SEQ.I.D NO : 5 中所示氨基酸序列的 CDRL2 区及其保守变体。在另一相关实施方案

中,所述分离的抗原结合区是具有 SEQ.I.D NO:6 中所示氨基酸序列的 CDRL3 区及其保守变体。

[0009] 在另一实施方案中,所述分离的抗原结合区是具有 SEQ.I.D NO:7 中所示可变区氨基酸序列,和在 CDR 区中与 SEQ ID NO:7 的 CDR 区具有至少 60、70、80、90 或 95% 序列同一性的序列的重链。在相关实施方案中,所述分离的抗原结合区是具有 SEQ.I.D NO:8 中所示可变区氨基酸序列,和在 CDR 区中与 SEQ ID NO:8 的 CDR 区具有至少 60、70、80、90 或 95% 序列同一性的序列的轻链。

[0010] 在另一方面,本发明提供针对 hTSLPR 的单克隆拮抗剂抗体。本发明一些抗 TSLPR 抗体与含有 SEQ ID NO:7 的重链可变区序列和 SEQ ID NO:8 的轻链可变区序列的参照抗体有相同的结合特异性。这些抗体中的一些抗体是完全人抗体,其显示与参照抗体相同的结合特异性。一些抗体具有 SEQ ID NO:1、2 或 3 的重链互补决定区 (CDR) 序列和 / 或 SEQ ID NO:4、5 或 6 的轻链 CDR 序列。

[0011] 一些抗 hTSLPR 抗体分别具有重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3; 和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列, SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6。本发明的一些其它抗体含有与 SEQ ID NO:7 具有至少 85% 同一性的重链可变区氨基酸序列和与 SEQ ID NO:8 具有至少 85% 同一性的轻链可变区氨基酸序列。本发明的一些其它抗 hTSLPR 抗体具有与 SEQ ID NO:7 相同的重链可变区氨基酸序列和与 SEQ ID NO:8 相同的轻链可变区氨基酸序列及人 IgG 恒定区 (例如 IgG1 或 IgG4)。

[0012] 本发明的一些抗 hTSLPR 抗体是小鼠抗体。一些其它抗体是嵌合抗体。一些所述嵌合抗体具有人重链恒定区和人轻链恒定区。本发明的一些其它抗 hTSLPR 抗体是人源化抗体。本发明的一些其它抗 hTSLPR 抗体是完全人抗体,其显示与含有 SEQ ID NO:7 的重链可变区序列和 SEQ ID NO:8 的轻链可变区序列的抗体相同的结合特异性。本发明还提供的是单链抗体,例如 Fab 片段。一些抗 hTSLPR 抗体是 IgG1 同种型。一些其它抗体是 IgG4 同种型。

[0013] 在另一方面,本发明提供分离或重组多核苷酸 (例如 DNA), 其编码含有本发明抗 hTSLPR 抗体的重链可变区或轻链可变区的多肽。例如,所述多核苷酸可分别编码含有如上述重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的抗体重链。所述多核苷酸还可分别编码含有如上述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的抗体轻链。本发明的一些多核苷酸编码成熟的重链可变区序列,其与 SEQ ID NO:7 的成熟区具有至少 90% 的同一性。一些其它多核苷酸编码成熟轻链可变区序列,其与 SEQ ID NO:8 的成熟区具有至少 90% 的同一性。这些多核苷酸中的一些编码与 SEQ ID NO:7 的成熟区相同的成熟重链可变区序列或与 SEQ ID NO:8 的成熟区相同的成熟轻链可变区序列。编码本发明重链和轻链的多核苷酸的示例性序列分别包括 SEQ.I.D.NO:13 和 14。

[0014] 在另一方面,本发明提供分离的宿主细胞,其包含 (1) 编码本发明抗 hTSLPR 抗体重链的重组 DNA 区段,和 (2) 编码本发明轻链的第二个重组 DNA 区段。在一些宿主细胞中,所述重组 DNA 区段分别有效连接第一个和第二个启动子,并能够在所述宿主细胞中表达。这些宿主细胞中的一些宿主细胞表达单克隆抗体,其分别具有重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列 (例如 SEQ.I.D.NO:1、2 和 3); 和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序

列（例如 SEQ.I.D.NO：4、5 和 6）。一些其它宿主细胞表达抗 hTSLPR 抗体，其含有与 SEQ ID NO：7 的成熟区具有至少 90% 同一性的成熟重链可变区序列；和与 SEQ ID NO：8 的成熟区具有至少 90% 同一性的成熟轻链可变区序列。这些宿主细胞中的一些宿主细胞表达抗 hTSLPR 抗体，其含有与 SEQ ID NO：7 的成熟区相同的成熟重链可变区序列和与 SEQ ID NO：8 的成熟区相同的成熟轻链可变区序列。一些宿主细胞是非人哺乳动物细胞（例如 CHO、NS0、SP2/0）。

[0015] 在另一方面，本发明提供在受试者，例如人类患者中治疗炎性疾病或病症的方法。这些方法需要向受试者施用含有有效量抗 hTSLPR 抗体的药物组合物。通常，所述抗 hTSLPR 抗体与含有 SEQ ID NO：7 的重链可变区序列和 SEQ ID NO：8 的轻链可变区序列的抗 hTSLPR 抗体有相同的结合特异性。在这些治疗方法中的一些方法中，使用完全人抗体。在一些方法中，所述抗 TSLPR 抗体分别包含重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列 SEQ.I.D.NO：1、2 和 3；和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列 SEQ.I.D.NO：4、5 和 6。在一些方法中，所使用的抗 hTSLPR 抗体含有与 SEQ ID NO：7 的成熟区相同的成熟重链可变区序列，和与 SEQ ID NO：8 的成熟区相同的成熟轻链可变区序列。一些方法涉及治疗患有变应性炎性疾病的受试者。易于治疗的变应性炎性疾病的实例包括遗传过敏性皮炎、哮喘和变应性鼻炎。

[0016] 在另一实施方案中，本发明提供抗体或其功能片段的分离的抗原结合区。在某些实施方案中，所述分离的抗原结合区包括具有 SEQ.I.D.NO：1 中所示氨基酸序列的 CDRH1 区，或其保守变体。如此处所用，所述保守变体包括任何鉴定的氨基酸序列中的氨基酸残基。在相关实施方案中，所述分离的抗原结合区是具有 SEQ.I.D.NO：2 中所示氨基酸序列的 CDRH2 区，或其保守变体。在另一相关实施方案中，所述分离的抗原结合区是具有 SEQ.I.D.NO：3 中所示氨基酸序列的 CDRH3 区，或其保守变体。

[0017] 在另一实施方案中，所述分离的抗原结合区是具有 SEQ.I.D.NO：4 中所示氨基酸序列的 CDRL1 区，或其保守变体。在另一相关实施方案中，所述分离的抗原结合区是具有 SEQ.I.D.NO：5 中所示氨基酸序列的 CDRL2 区，或其保守变体。在另一相关实施方案中，所述分离的抗原结合区是具有 SEQ.I.D.NO：6 中所示氨基酸序列的 CDRL3 区，或其保守变体。

[0018] 在另一实施方案中，所述分离的抗原结合区是具有 SEQ.I.D.NO：7 中所示可变区氨基酸序列，和在 CDR 区中与 SEQ.I.D.NO：7 的 CDR 区具有至少 60、70、80、90、或 95% 序列同一性的序列的重链。在相关实施方案中，所述分离的抗原结合区是具有 SEQ.I.D.NO：8 中所示可变区氨基酸序列，和在 CDR 区中与 SEQ.I.D.NO：8 的 CDR 区具有至少 60、70、80、90、或 95% 序列同一性的序列的轻链。

[0019] 在另一方面，本发明提供针对 hTSLPR 的单克隆拮抗剂抗体。本发明的一些抗 TSLPR 抗体与含有 SEQ ID NO：7 的重链可变区序列和 SEQ ID NO：8 的轻链可变区序列的参照抗体具有相同的结合特异性。这些抗体中的一些抗体是完全人抗体，其显示与参照抗体相同的结合特异性。

[0020] 在另一方面，本发明提供分离或重组多核苷酸（例如 DNA），其编码含有本发明抗 hTSLPR 抗体的重链可变区或轻链可变区的多肽。例如，所述多核苷酸可分别编码含有如上述重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的抗体重链。所述多核苷酸还可分别编码含有

如上述 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列的抗体轻链。本发明的一些多核苷酸编码成熟的重链可变区序列，其与 SEQ ID NO：7 的成熟区具有至少 90% 的同一性。一些其它多核苷酸编码成熟轻链可变区序列，其与 SEQ ID NO：8 的成熟区具有至少 90% 的同一性。这些多核苷酸中的一些编码与 SEQ ID NO：7 的成熟区相同的成熟重链可变区序列或与 SEQ ID NO：8 的成熟区相同的成熟轻链可变区序列。

[0021] 在另一方面，本发明提供分离的宿主细胞，其包含 (1) 编码本发明抗 hTSLPR 抗体的重链的重组 DNA 区段，和 (2) 编码该抗体轻链的第二个重组 DNA 区段。在一些宿主细胞中，所述重组 DNA 区段分别有效连接第一个和第二个启动子，并能够在所述宿主细胞中表达。这些宿主细胞中的一些宿主细胞表达单克隆抗体，其分别具有重链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列（例如 SEQ.I.D.NO：1、2 和 3）；和轻链 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列（例如 SEQ.I.D.NO：4、5 和 6）。一些其它宿主细胞表达抗 hTSLPR 抗体，其含有与 SEQ ID NO：7 的成熟区具有至少 90% 同一性的成熟重链可变区序列；和与 SEQ ID NO：8 的成熟区具有至少 90% 同一性的成熟轻链可变区序列。这些宿主细胞中的一些宿主细胞表达抗 hTSLPR 抗体，其含有与 SEQ ID NO：7 的成熟区相同的成熟重链可变区序列和与 SEQ ID NO：8 的成熟区相同的成熟轻链可变区序列。一些宿主细胞是非人哺乳动物细胞（例如 CHO、NS0、SP2/0）。

[0022] 在另一方面，本发明提供在受试者，例如人类患者中治疗炎症性疾病或病症的方法。这些方法需要向受试者施用含有有效量抗 hTSLPR 抗体的药物组合物。通常，所述抗 hTSLPR 抗体与含有 SEQ ID NO：7 的重链可变区序列和 SEQ ID NO：8 的轻链可变区序列的抗 hTSLPR 抗体和 / 或包含 SEQ.I.D.NO：9 的重链和 SEQ.I.D.NO：10 的轻链的分离抗体具有相同的结合特异性。在这些治疗方法中的一些方法中，使用完全人抗体。一些方法旨在治疗患有变应性炎症性疾病的受试者。易于治疗的变应性炎症性疾病的实例包括遗传过敏性皮炎、哮喘和变应性鼻炎。

[0023] 在本发明其它方面提供了包含（或组成为）SEQ.I.D.NO：9 的重链和 SEQ.I.D.NO：10 的轻链的分离的抗 hTSLPR 抗体。本发明还提供包含抗体以及已知并根据公认药物实践提倡的药学上可接受的载体的药物组合物，抗体包含（或组成为）SEQ.I.D.NO：9 的重链和 SEQ.I.D.NO：10 的轻链。

[0024] 在另一实施方案中，本发明提供由第一组分（其为抗体或其片段）和具有第二种氨基酸序列的第二组分组成的免疫缀合物。例如，所述免疫缀合物是细胞毒素，或所述免疫缀合物是对与 hTSLPR 不同的靶标具有结合特异性的结合蛋白质或抗体。

[0025] 在另一实施方案中，本发明提供具有如上述本发明抗体或其抗体片段（例如 SEQ.I.D.NO：9 和 10 的抗体）的药盒。在一些实施方案中，所述药盒还含有药学上可接受的载体或赋形剂。在其它相关实施方案中，所述药盒中的抗体以单位剂量存在。在另一相关实施方案中，所述药盒包括向受试者施用的使用说明书。

[0026] 通过参考说明书的剩余部分和权利要求书可实现对本发明性质和优势的进一步理解。

[0027] 附图简述

[0028] 图 1.ELISA 中 NV163-1 Fab' 和 NV164-1-Fab' 与人 TSLPR 的结合。用 hTSLPR 包被 ELISA 板。所述平板连续与抗 hTSLPR Fab'、HRP-缀合的山羊抗人 IgG、

F(ab')₂ 特异性抗体和 TMB 底物温育。如说明使用浓度范围为 2.1×10^{-14} 到 3.3×10^{-8} M 的 NV163-1-Fab' 和 NV164-1-Fab'。NV-164-1 包含 SEQ.I.D.NO: 7 和 8 的可变区。NV164-1-IgG1 由 SEQ.I.D.NO: 9 的重链和 SEQ.I.D.NO: 10 的轻链组成, NV164-1 是本发明的一个实施方案。NV161-1 包含 SEQ.I.D.NO: 21 和 SEQ.I.D.NO: 22 的可变区。

[0029] 图 2.ELISA 中 NV163-1-Fab' 和 NV164-1-Fab' 与人 TSLPR、小鼠 TSLPR 及人 IL7R α 的结合特异性。用 hTSLPR、mTSLPR 或 hIL7Ra 包被 ELISA 板。所述平板与抗 hTSLPR Fab' 温育, 然后与 HRP- 缀合的山羊抗人 IgG、F(ab')₂ 特异性抗体和 TMB 底物温育。如说明使用浓度范围为 2.1×10^{-14} 到 3.3×10^{-8} M 的 Nv163-1-Fab' 和 nv164-1-Fab'。

[0030] 图 3. 在萤光素酶报告基因测定中 NV163-1-Fab' 和 NV164-1-Fab' 的拮抗剂活性。稳定过表达 hTSLPR/hIL7R α /Stat5-Luc 的 Ba/F3 细胞与 Fab' 预温育, 然后用 1ng/ml 人 TSLP 进行刺激。6 小时温育后, 使用 Bright-Glo 测定萤光素酶活性。如说明, 使用浓度范围为 1.7×10^{-13} 到 3.0×10^{-8} M 的 NV163-1-Fab' 和 NV164-1-Fab'。该图代表了许多独立实验。对于 NV163-1-Fab', IC₅₀ 是 2.7 ± 1.9 nM, 对于 NV164-1-Fab', IC₅₀ 是 4.0 ± 2.1 nM (n = 4)。

[0031] 图 4.ELISA 中 NVP164-1-IgG1 与人 TSLPR、小鼠 TSLPR 及人 IL7R α 的结合特异性。用 hTSLPR、mTSLPR 或 hIL7Ra 包被 ELISA 板。所述平板与抗 hTSLPR、NVP-164-IgG1 温育, 然后与 HRP- 缀合的山羊抗人 IgG、F(ab')₂ 特异性抗体和 TMB 底物温育。如说明, 使用浓度范围为 1.2×10^{-17} 到 1.2×10^{-7} M 的 NVP164-1-IgG1。

[0032] 图 5.ELISA 中 NVP164-1-IgG1 与人及猕猴 TSLPR 的交叉反应性。用 hTSLPR 或 cTSLPR 包被 ELISA 板。所述平板与抗 hTSLPR、NVP-164-IgG1 温育, 然后与 HRP- 缀合的山羊抗人 IgG、F(ab')₂ 特异性抗体和 TMB 底物温育。如说明, 使用浓度范围为 2.1×10^{-14} 到 1.0×10^{-7} M 的 NVP164-1-IgG1。

[0033] 图 6.ELISA 中 NV164-1-IgG1 和 NV115-3B-IgG1 与人 TSLPR 的结合。用 hTSLPR 包被 ELISA 板。所述平板与 NV164-1-IgG1 或 NV115-3B-IgG1 温育, 然后与 HRP- 缀合的山羊抗人 IgG、F(ab')₂ 特异性抗体和 TMB 底物温育。如说明, 使用浓度范围为 2.1×10^{-14} 到 1.0×10^{-7} M 的 NVP164-1-IgG1 和 NV115-3B-IgG1。

[0034] 图 7. 萤光素酶报告基因测定中 NV164-1-IgG1 和 NV115-3B-IgG1 的拮抗剂活性。稳定过表达 hTSLPR/hIL7R α /Stat5-Luc 的 Ba/F3 细胞与抗体预温育, 然后用 1ng/ml 重组人 TSLP 进行刺激。6 小时温育后, 使用 Bright-Glo (Promega) 测定萤光素酶活性。如说明, 使用浓度范围为 1.7×10^{-13} 到 3.0×10^{-8} M 的抗体。该图来自代表性独立实验中的一个实验。对于 NV164-1-IgG1 (n = 8), IC₅₀ 是 221 ± 101 pM, 对于 NV115-3B-IgG1 (n = 6), IC₅₀ 是 126 ± 72 pM。

[0035] 图 8. 萤光素酶报告基因测定中 NV164-1-IgG1 和 NV115-3B-IgG1 针对天然来源 TSLP 的拮抗剂活性。稳定过表达 hTSLPR/hIL7Ra/Stat5-Luc 的 Ba/F3 细胞与抗体预温育, 然后用 1ng/ml 天然人 TSLP 进行刺激。6 小时温育后, 使用 Bright-Glo 测定萤光素酶活性。如说明, 使用浓度范围为 6.7×10^{-14} 到 6.7×10^{-9} M 的抗体。对于 NV164-1-IgG1, IC₅₀ 是 40 ± 10 pM, 对于 NV115-3B-IgG1, IC₅₀ 是 50 ± 25 pM。

[0036] 图 9. 抑制 TARC 从原代人单核细胞中的分泌。从健康成人志愿者中收集人血。

通过 Ficoll 密度离心分离 PBMC。使用单核细胞分离试剂盒 (Monocyte Isolation kit II) (Miltenyi Biotec) 分离单核细胞。新鲜分离的单核细胞与抗体温育 20 分钟, 然后用 1ng/ml 人 TSLP 处理 24 小时。通过夹层 ELISA 测定分泌的 TARC 的量。如说明, 使用浓度为 6.7×10^{-13} 到 6.7×10^{-8} M 的抗体。对于 NV164-1-IgG1, IC_{50} 是 11 ± 10 pM, 对于 NV115-3B-IgG1, IC_{50} 是 10 ± 4 pM。

[0037] 图 10A 到 C: 单次剂量猕猴药物代谢动力学数据。通过竞争 ELISA 测定血液中残留的抗体量。在更迟时间点上观察到的升高的游离抗体滴度说明标记的抗体与抗独特型抗体结合, 并因此不能结合到 ELISA 板上。这反过来揭示了免疫原性。

[0038] 发明详述

[0039] 本发明部分基于由本发明人根据针对人 TSLPR 的拮抗剂抗体的开发。发现小鼠中产生的抗 hTSLPR 抗体或体外产生的嵌合抗 hTSLPR 抗体能够抑制 TSLP 信号转导介导的活性, 例如 TSLP 介导的细胞增殖。因此, 这些抗体可用作针对由 TSLP 信号转导活性介导的或与 TSLP 信号转导活性相关的许多疾病或病症 (例如, 变应性炎性疾病, 如遗传过敏性皮炎和哮喘) 的治疗剂或预防剂。以下部分提供了制备并使用本发明组合物, 及实施本发明方法的指导。

[0040] I. 定义

[0041] 除非另有说明, 此处所用的所有技术和科学术语具有如本发明所属技术领域中普通技术人员通常理解的同意思。以下参考文献为技术人员提供了用于本发明的许多术语的一般定义: Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Smith 等 (编辑), Oxford University Press (校正版, 2000); Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Singleton 等 (编辑), John Wiley & Sons (第 3 版, 2002); 和 A Dictionary of Biology (Oxford Paperback Reference), Martin and Hine (编辑), Oxford University Press (第 4 版, 2000)。此外, 提供以下定义帮助读者实施本发明。

[0042] 为了更容易理解本发明, 首先定义某些术语。在整个详细说明中阐明额外的定义。

[0043] 术语“免疫反应”指例如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞和上述细胞或肝产生的可溶性大分子 (包括抗体、细胞因子和补体) 的作用, 其导致入侵病原体、感染病原体的细胞或组织、癌细胞, 或在自身免疫或病理学炎症的情况下正常的人细胞或组织对人体的选择性损伤、破坏或从人体的清除。

[0044] “信号转导途径”指多种信号转导分子之间的生化关系, 所述信号转导分子在信号从细胞的一部分转移到细胞另一部分中起作用。

[0045] 此处涉及的术语“抗体”包括完整抗体和任何抗原结合片段 (即, “抗原结合部分”) 或其单链。天然发生的“抗体”是包含通过二硫键相互连接的至少两条重 (H) 链和两条轻 (L) 链的糖蛋白。每条重链包含重链可变区 (此处简称为 V_H) 和重链恒定区。所述重链恒定区包含三个结构域, CH1、CH2 和 CH3。每条轻链包含轻链可变区 (此处简称为 V_L) 和轻链恒定区。所述轻链恒定区包含一个结构域 C_L 。 V_H 和 V_L 区可进一步分成高变区, 称为互补决定区 (CDR), 其散布更保守的称为构架区 (FR) 的区域。每个 V_H 和 V_L 包含从氨基末端到羧基末端以下面顺序排列的三个 CDR 和四个 FR: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合域。

抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的多种细胞（例如效应细胞）及经典补体系统的第一个组分（C1q）的结合。

[0046] 如此处所用，术语抗体的“抗原结合部分”（或简单的“抗原部分”）指全长抗体或抗体的一个或更多个片段，其保留特异性结合抗原（例如 TSLPR）的能力。已经显示全长抗体的片段可进行抗体的抗原结合功能。术语抗体的“抗原结合部分”中包含的结合片段的实例包括 Fab 片段：由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 CH1 结构域组成的单价片段； $F(ab)_2$ 片段：包含在铰链区通过二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段；由 V_H 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；由抗体单个臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的 Fv 片段；dAb 片段（Ward 等，1989 Nature 341 : 544-546），其由 V_H 结构域组成；和分离的互补决定区（CDR）。

[0047] 此外，尽管 Fv 片段的两个结构域 V_L 和 V_H 由分离的基因编码，但使用重组方法，通过能够将它们制备成单条蛋白质链的合成接头将它们连接，在所述单条蛋白质链中 V_L 和 V_H 区配对形成单价分子（称为单链 Fv(scFv)；参阅例如 Bird 等，1988 Science 242 : 423-426；和 Huston 等，1988 Proc.Natl.Acad.Sci.85 : 5879-5883)。术语抗体的“抗原结合部分”也旨在包括此类单链抗体。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段，并以与完整抗体相同的方式筛选片段的效用。

[0048] 如此处所用，“分离的抗体”指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体（例如，特异性结合 TSLPR 的分离的抗体基本上不含特异性结合除 TSLPR 之外的抗原的抗体）。然而，特异性结合 TSLPR 的分离的抗体可与其它抗原，如来自其它物种的 TSLPR 分子具有交叉反应性。此外，分离的抗体可基本上不含其它细胞物质和 / 或化学物质。

[0049] 如此处所用术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”指单分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物对特定表位显示单一的结合特异性和亲和力。

[0050] 如此处所用，术语“人抗体”旨在包括具有可变区的抗体，在所述可变区中构架区和 CDR 区均来自人来源序列。此外，如果所述抗体含有恒定区，所述恒定区也来自此类人序列，例如人种系序列，或人种系序列的突变版本。本发明的人抗体可包括并非由人序列编码的氨基酸残基（例如，通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的突变）。

[0051] 术语“人单克隆抗体”指具有可变区的显示单一结合特异性的抗体，其中构架区和 CDR 区均来自人序列。在一个实施方案中，由杂交瘤产生人单克隆抗体，所述杂交瘤包括从转基因非人动物，例如具有包含融合到无限增殖细胞中的人重链转基因和轻链转基因的基因组的转基因小鼠中获得的 B 细胞。

[0052] 如此处所用，术语“重组人抗体”包括通过重组手段制备、表达、产生或分离的所有人抗体，如从对人免疫球蛋白基因为转基因或转染色体的动物（例如，小鼠）或由其制备的杂交瘤中分离的抗体、从转化以表达人抗体的宿主细胞，例如从转染瘤中分离的抗体、从重组的组合人抗体库中分离的抗体和通过涉及将全部或部分人免疫球蛋白基因、序列剪接成其它 DNA 序列的任何手段制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有可变区，其中所述构架区和 CDR 区均来自人种系免疫球蛋白序列。然而，在某些实施方案中，此类重组人抗体可进行体外诱变（或者，当使用对人 Ig 序列为转基因的动物时，进行体内体细胞诱变），并因此重组抗体的 V_H 和 V_L 区的氨基酸序列是这样的

序列，当来自并与人种系 V_H 和 V_L 序列相关时，其可能并不天然存在于体内人抗体种系所有组成成分中。

[0053] “嵌合抗体”是这样的抗体分子，其中 (a) 恒定区或其部分被改变、替换或交换，使得抗原结合位点（可变区）连接不同或改变类型、效应功能和 / 或种类的恒定区，或完全不同的分子，例如酶、毒素、激素、生长因子、药物等，其赋予所述嵌合抗体新的性质；或 (b) 所述可变区或其部分被具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、替换或交换。例如，如下文实施例中所示，可通过用来自人免疫球蛋白的恒定区替换其恒定区来修饰小鼠抗 hTSLPR 抗体。由于用人恒定区进行替换，所述嵌合抗体可保留其识别人 TSLPR 的特异性，同时与原始小鼠抗体相比在人中具有降低的抗原性。

[0054] “人源化”抗体是保留非人抗体的反应性同时在人中具有更低免疫原性的抗体。这例如可以通过保留非人 CDR 区并用其人类对应物（即，恒定区以及可变区的构架部分）替换抗体的剩余部分实现。参阅例如，Morrison 等，*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 81 : 6851-6855, 1984 ; Morrison 和 Oi, *Adv.Immunol.*, 44 : 65-92, 1988 ; Verhoeyen 等, *Science*, 239 : 1534-1536, 1988 ; Padlan, *Molec.Immun.*, 28 : 489-498, 1991 ; 和 Padlan, *Molec.Immun.*, 31 : 169-217, 1994。人体工程技术的其它实例包括，但不限于在 US 5,766,886 中公开的 Xoma 技术。

[0055] 如此处所用，术语“Humaneering”指用于将非人抗体转化成改造的人抗体的方法（参阅例如，KaloBios’ Humaneering™ 技术）。

[0056] 如此处所用，“同种型”指重链恒定区基因提供的抗体类型（例如，IgM、IgE、IgG 如 IgG1 或 IgG4）。

[0057] 短语“识别抗原的抗体”，和“对抗原特异性的抗体”在此处与术语“特异性结合抗原的抗体”可互换使用。

[0058] 如此处所用，“特异性结合人 TSLPR”的抗体指以 200×10^{-12} M 或更低、 150×10^{-12} M 或更低，或 100×10^{-12} M 或更低的 K_D 结合人 TSLPR 的抗体。

[0059] 如此处所用，术语“结合特异性”指各抗体结合位点与唯一一个抗原决定簇反应的能力。抗体的结合位点位于分子的 Fab 部分中，并由重链和轻链的高变区构成。抗体的结合亲和力是单个抗原决定簇与抗体上单个结合位点之间反应的强度。吸引力和排斥力的总和驱动抗原决定簇与抗体结合位点之间的运行。亲和力是描述抗原-抗体反应的平衡常数。

[0060] 两个实体之间的特异性结合表示具有至少 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 、 $10^8 M^{-1}$ 、 $10^9 M^{-1}$ 或 $10^{10} M^{-1}$ 的平衡常数 (K_A) 的结合。短语“特异性（或选择性）结合”抗体（例如，抗 hTSLPR 抗体）指决定蛋白质和其它生物产品的异质群体中关联抗原（例如，人 TSLPR 多肽）存在的结合反应。除了上文指出的平衡常数 (K_A)，本发明的抗 hTSLPR 抗体通常还具有约 $1 \times 10^{-2} s^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ 或更低的解离常数 (K_d)，并以比其结合非特异性抗原（例如 BSA）的亲和力高至少两倍的亲和力结合人 TSLPR。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原特异的抗体”与“特异性结合抗原的抗体”在此处可互换使用。

[0061] 术语“表位”表示能够特异性结合抗体的蛋白质决定簇。表位通常由分子的化学活性表面基团如氨基酸或糖侧链组成，并通常具有特定的三维结构特征，以及特异的荷电特性。可区分构象和非构象表位，因为在变性溶剂存在下失去前者而非后者的结

合。

[0062] 术语“核酸”与“多核苷酸”在此处可互换使用，并指单链或双链形式的脱氧核糖核酸或核糖核酸及其多聚体。所述术语包括含有已知核苷酸类似物或修饰主链残基或连接的核酸，其为合成的、天然发生的和非天然发生的，其与参考核酸具有类似的结合特性，并且其以与参考核苷酸类似的方式进行代谢。此类类似物的实例包括，但不限于，硫代磷酸酯、磷酸酰胺、甲基膦酸酯、手性甲基膦酸酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽-核酸(PNA)。

[0063] 除非另有说明，特定的核酸序列也暗含包括其保守修饰的变体(例如，简并密码子替代)和互补序列，以及明确指出的序列。尤其是，如下文详细说明，可通过产生其中一个或更多个所选(或全部)密码子的第三个位置被混和碱基和/或脱氧肌苷残基替代的序列来完成简并密码子的替代(Batzer等, *Nucleic Acid Res.*19: 5081, 1991; Ohtsuka等, *J.Biol.Chem.*260: 2605-2608, 1985; 和 Rossolini等, *Mol.Cell.Probes* 8: 91-98, 1994)。

[0064] 术语“氨基酸”指天然发生的和合成的氨基酸，以及以与天然发生氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然发生的氨基酸是由遗传密码子编码的那些氨基酸，以及稍后被修饰的那些氨基酸，例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指与天然发生的氨基酸具有相同基本化学结构，即结合氢的 α 碳、羧基、氨基和R基团的化合物，例如，高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。此类类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽主链，但保留与天然发生氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指化合物，其具有与氨基酸一般化学结构不同的结构，但以与天然发生氨基酸类似的方式起作用。

[0065] 术语“多肽”和“蛋白质”此处可互换使用，以表示氨基酸残基的聚合物。所述术语应用于氨基酸聚合物，其中一个或更多个氨基酸残基是相应的天然发生氨基酸的人工化学模拟物，以及天然发生的氨基酸聚合物和非天然发生的氨基酸聚合物。除非另有说明，特定的多肽序列也暗含包括其保守修饰的变体。

[0066] 术语“保守修饰的变体”应用于氨基酸和核酸序列。对于特定核酸序列，保守修饰的变体指编码相同或基本相同氨基酸序列的那些核酸，或在所述核酸不编码氨基酸序列时，指基本相同的序列。因为遗传密码的简并性，大量功能相同的核酸编码任何给定蛋白质。例如，密码子GCA、GCC、GCG和GCU均可编码氨基酸丙氨酸。因此，在丙氨酸被密码子定义的任何位置，可将所述密码子改变成相应的任何所述密码子，而不改变所编码的多肽。此类核酸变异是“沉默变异”，其为保守修饰变异的一种。此处编码多肽的每一核酸序列还描述了核酸的每一种可能的沉默变异。技术人员将认识到可修饰核酸中的各个密码子(除AUG，其通常仅是甲硫氨酸的密码子，和TGG，其通常仅是色氨酸的密码子)，以产生功能相同的分子。因此，在每一所述序列中暗含编码多肽的核酸的各个沉默变异。

[0067] 对于多肽序列，“保守修饰的变体”包括对多肽序列的各种替代、缺失和添加，其导致氨基酸被化学上类似的氨基酸替代。提供功能类似氨基酸的保守替代为本领域所熟知。此类保守修饰的变体除了并且不排除多态变体、种间同源物和本发明等位基因。以下8组含有彼此保守替代的氨基酸：

- [0068] 1) 丙氨酸 (A), 甘氨酸 (G);
- [0069] 2) 天冬氨酸 (D), 谷氨酸 (E);
- [0070] 3) 天冬酰胺 (N), 谷氨酰胺 (Q);
- [0071] 4) 精氨酸 (R), 赖氨酸 (K);
- [0072] 5) 异亮氨酸 (I), 亮氨酸 (L), 甲硫氨酸 (M), 缬氨酸 (V);
- [0073] 6) 苯丙氨酸 (F), 酪氨酸 (Y), 色氨酸 (W);
- [0074] 7) 丝氨酸 (S), 苏氨酸 (T); 和
- [0075] 8) 半胱氨酸 (C), 甲硫氨酸 (M) (参阅例如, Creighton, *Proteins*(1984))。

[0076] 在两条或更多条核酸或多肽序列的上下文中, 术语“相同”或百分比“同一性”指相同的两条或更多条序列或子序列。当在比较窗或指定区域范围内, 使用一种以下序列比较算法或通过手动比对和目检测定来比较并比对最大对应时, 如果两条序列具有特定百分比的相同的氨基酸残基或核苷酸(即, 在特定区域内或未特定说明时, 在整个序列范围内 60%同一性, 任选地 65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 99%同一性), 那么两条序列“基本相同”。任选地, 所述同一性存在于长度为至少约 50 个核苷酸(或 10 个氨基酸)的区域范围内, 或更优选在长度为至少 100 到 500 或 1000 或更多个核苷酸(或 20、50、200 或更多个氨基酸)的区域范围内。

[0077] 对于序列比较, 通常, 一条序列作为参考序列, 测试序列与其进行比较。当使用序列比较算法时, 将测试序列和参考序列输入计算机, 需要时指定子序列坐标, 并指定序列算法程序参数。可使用默认程序参数, 或可指定备选参数。所述序列比较算法然后基于程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列百分比同一性。

[0078] 如此处所用, “比较窗”包括参考选自 20 到 600, 通常约 50 到约 200, 更通常约 100 到约 150 的任何一个相邻位置数目的区段, 其中两条序列进行最佳比对后, 序列可与在相同数目的相邻位置的参考序列进行比较。用于比较的序列比对方法为本领域所熟知。例如可通过 Smith 和 Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2: 482c 的局部同源性算法、Needleman 和 Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970 的同源性比对算法、Pearson 和 Lipman, *Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA* 85: 2444, 1988 的搜索相似性方法、这些算法的计算机实现 (Wisconsin Genetics Software Package 中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), 或手动比对和目检 (参阅例如 Brent 等, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (ringbou 编辑, 2003)) 进行序列的最佳比对用于比较。

[0079] 适合于测定百分比序列同一性和序列相似性的算法的两个实例是 BLAST 和 BLAST 2.0 算法, 其分别描述于 Altschul 等, *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402, 1977; 和 Altschul 等, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, 1990 中。可从 National Center for Biotechnology Information 获得用于进行 BLAST 分析的软件。该算法涉及首先通过鉴定查询序列中长度为 W 的短字来鉴定高得分序列对 (HSP), 当与数据库序列中相同长度的字比对时, 所述查询序列中长度为 W 的短字匹配或满足一定正阈值得分 T。T 指相邻字得分阈值 (Altschul 等, 上文)。这些初始相邻字作为起始搜索以发现含有它们的更长 HSP 的种子起作用。字沿每条序列的两个方向延伸, 只要能提高累积比对得分。对于核苷酸序列, 使用参数 M (一对匹配残基的奖赏得分; 通常 > 0) 和 N (错配残基的惩罚得分; 通常 < 0) 计算累积

得分。对于氨基酸序列，使用得分矩阵计算累积得分。各方向上字的延伸当出现以下情况时终止：累积比对得分从其最高实现值降低量 X ；由于一个或更多个负值残基比对的累积，累积得分达到零或零以下；或者到达任一序列的末端。BLAST 算法参数 W 、 T 和 X 决定了比对的灵敏度和速度。BLASTN 程序（用于核苷酸序列）使用默认字长 (W) 11、期望值 (E) 10、 $M = 5$ 、 $N = -4$ 和两条链的比较。对于氨基酸序列，BLASTP 程序使用默认字长 (W) 3、期望值 (E) 10 和 BLOSUM62 得分矩阵（参阅 Henikoff 和 Henikoff, Proc. Natl.Acad.Sci.USA 89 : 10915, 1989），比对 (B) 50、期望值 (E) 10、 $M = 5$ 、 $N = -4$ 和两条链的比较。

[0080] BLAST 算法也进行两条序列间相似性的统计学分析（参阅例如，Karlin 和 Altschul, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 : 5873-5787, 1993）。BLAST 算法提供的相似性的一种度量是最小总和概率 ($P(N)$)，其提供概率的指示，通过这种概率，两条核苷酸或氨基酸序列之间的匹配可能是偶然发生的。例如，如果测试核酸与参考核酸的比较中最小总和概率小于约 0.2，更优选小于约 0.01，并最优选小于约 0.001，那么认为核酸与参考序列相似。

[0081] 除了上面提到的序列同一性百分比，两条核酸序列或多肽基本相同的另一指征是第一个核酸编码的多肽与针对第二个核酸编码的多肽产生的抗体免疫交叉反应，如下所述。因此，例如当两个肽仅是保守替代不同，那么多肽与第二条多肽基本相同。两条核酸序列基本相同的另一指征是两个分子或其互补序列在严格条件下彼此杂交，如下所述。两条核酸序列基本相同的另一指征是相同的引物可用于扩增序列。

[0082] 术语“有效连接”指两个或更多个多核苷酸（例如 DNA）区段之间的功能关系。通常，其指转录调节序列与转录的序列的功能关系。例如，如果启动子或增强子序列在适当宿主细胞或其它表达系统中刺激或调节编码序列的转录，那么启动子或增强子序列有效连接编码序列。一般，有效连接转录序列的启动子转录调节序列在物理位置上邻近转录序列，即它们顺式起作用。然而，一些转录调节序列，如增强子不需要在物理位置上邻近或位于转录被其增强的编码序列附近。

[0083] 术语“载体”旨在表示多核苷酸分子，其能够转运其已经连接另一多核苷酸。一种类型的载体是“质粒”，其指其中连接额外 DNA 区段的环形双链 DNA 环。另一种类型的载体是病毒载体，其中额外的 DNA 区段可连接至病毒基因组中。某些载体能够在引入它们的宿主细胞中进行自主复制（例如，具有细菌复制起始区的细菌载体和附加型哺乳动物载体）。其它载体（例如非附加型哺乳动物载体）可在引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中，并因此随所述宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够指导它们有效连接的基因的表达。此类载体此处称作“重组表达载体”（或简单地，“表达载体”）。通常，重组 DNA 技术中使用的表达载体经常是质粒形式。在本说明书中，因为质粒是最常用的载体形式，所以“质粒”和“载体”可互换使用。然而，本发明旨在包括此类其它形式的表达载体，如病毒载体（例如，复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒），其具有等同功能。

[0084] 术语“重组宿主细胞”（或简单地“宿主细胞”）指已经引入重组表达载体的细胞。应理解这种术语旨在不仅指特定受试者细胞，还指该细胞的后代。因为在连续世代中由于突变或环境影响可发生某些修饰，事实上，该后代可以与亲本细胞不相同，但

仍然包括在此处所用术语“宿主细胞”的范围内。

[0085] 术语“炎性疾病或状况”指特征是在损伤或感染位点具有局部炎症的任何状况，并包括自身免疫性疾病、某些形式的传染性炎症状况、特征为器官移植或其它植入的不想要的中性粒细胞活性和特征是局部组织部位上不想要的中性粒细胞累积的任何其它状况。这些状况包括但不限于脑膜炎、脑水肿、关节炎、肾炎、成人呼吸窘迫综合征、胰腺炎、肌炎、神经炎、结缔组织疾病、静脉炎、动脉炎、血管炎、变态反应、过敏反应、埃里希体病、痛风、器官移植和 / 或溃疡性结肠炎。

[0086] 术语“受试者”包括人和非人动物。非人动物包括所有的脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物，如非人灵长类、绵羊、狗、奶牛、鸡、两栖动物和爬行动物。除非另有指出，术语“患者”或“受试者”在此处可互换使用。

[0087] 术语“治疗”包括施用化合物或试剂，以预防或延迟症状的开始、并发症、或疾病（例如变应性炎性疾病）的生物化学指征，减缓症状或阻止或抑制疾病、状况或病症的进一步发展。治疗可以是预防性的（以预防或延迟疾病开始，或预防其临床或亚临床症状的显现）或是治疗性抑制，或在疾病显现后减缓症状。

[0088] 短语“信号转导途径”或“信号途径”（例如，TSLP 信号途径）指至少一种生物化学反应，但更经常指一系列生物化学反应，其起因于细胞与刺激化合物或试剂的相互作用。因此，刺激化合物（例如 TSLP）与细胞之间的相互作用产生通过信号转导途径传递的“信号”，最终引起细胞反应，例如免疫反应。

[0089] II. 针对人 TSLPR 的拮抗剂抗体

[0090] 1. 综述

[0091] 本发明提供特异性结合人 TSLPR 的抗体。这些抗 hTSLPR 抗体能够拮抗 TSLP 介导的信号转导活性，例如下文实施例中描述的 TSLP 介导的细胞增殖。用于制备单克隆或多克隆抗体的一般方法为本领域所熟知。参阅例如 Harlow & Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual*, ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1998 ; Kohler & Milstein, *Nature* 256 : 495-497, 1975 ; Kozbor 等, *Immunology Today* 4 : 72, 1983 ; 和 Cole 等, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, 1985 中第 77-96 页。

[0092] 优选地，本发明的抗 hTSLPR 抗体是单克隆抗体。单克隆抗体指来自单一克隆的抗体。可使用用于产生单克隆抗体的任何技术来产生本发明的抗 hTSLPR 抗体，例如 B 淋巴细胞的病毒或致癌性转化。制备杂交瘤的一种动物系统是鼠类系统。小鼠中的杂交瘤制备是良好建立的程序。如下文实施例中说明，可通过用 hTSLPR 多肽或片段、融合蛋白，或其变体免疫非人动物（例如小鼠）产生单克隆抗 hTSLPR 抗体。从动物中分离的 B 细胞然后与骨髓瘤细胞融合，以产生抗体产生杂交瘤。在 ELISA 测定中，可使用 hTSLPR 多肽或融合蛋白，通过筛选杂交瘤获得单克隆小鼠抗 hTSLPR 抗体。用于分离免疫脾细胞来融合的免疫方案和技术为本领域已知。融合伴侣（例如鼠类骨髓瘤细胞）和融合方法也为本领域所熟知，例如 Harlow & Lane, 上文。

[0093] 抗体主要通过定位在六条重链和轻链互补决定区 (CDR' s) 中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。通常，本发明的抗 hTSLPR 抗体具有与在 SEQ.I.D.NO : 1、2、3、4、5 和 6 中描述的 CDR 序列相同的至少一个重链 CDR 序列或轻链 CDR 序列。本发明的一些

抗 hTSLPR 抗体具有分别与 SEQ.I.D.NO : 7 和 8 中描述序列相同的重链和轻链的可变区。

[0094] 本发明的抗 hTSLPR 抗体可以是含有两条重链和两条轻链的完整抗体。它们也可以是完整抗体的抗原结合片段或单链抗体。本发明的抗 hTSLPR 抗体包括在非人动物中产生的抗体。它们也包括修饰的抗体，其为此处描述的抗 hTSLPR 抗体的修饰形式。经常，所述修饰的抗体是重组抗体，其相对于示例的小鼠抗体具有相似或改善的性质。例如，可通过缺失恒定区并用可导致延长的半衰期（例如抗体的血清半衰期、稳定性或亲和力）的不同恒定区替换所述恒定区来修饰在下文实施例中示例的小鼠抗 hTSLPR 抗体。例如可通过构建表达载体产生修饰的抗体，所述表达载体包括来自小鼠抗体的移植到来自具有不同性质的不同抗体的构架序列上的 CDR 序列 (Jones 等, 1986, Nature 321, 522-525)。可从公共 DNA 数据库中获得此类构架序列。

[0095] 一些修饰抗体是嵌合抗体，其含有部分人的免疫球蛋白序列（例如恒定区）和部分非人的免疫球蛋白序列。一些其它修饰的抗体是人源化抗体。通常，人源化抗体具有从非人来源引入的一个或多个氨基酸残基。人源化非人抗体的方法为本领域所熟知，例如美国专利号 5,585,089 和 5,693,762；Jones 等, Nature 321 : 522-25, 1986；Riechmann 等, Nature 332 : 323-27, 1988；和 Verhoeyen 等, Science 239 : 1534-36, 1988。可容易地使用这些方法，通过将来自非人抗 hTSLPR 抗体的至少一部分 CDR 替代为人抗体的相应区域来产生本发明的人源化抗 hTSLPR 抗体。在一些实施方案中，本发明的人源化抗 hTSLPR 抗体的每条免疫球蛋白链（即 SEQ.I.D.NO : 1、2、3、4、5 和 6）具有全部的三个 CDR，其移植到相应的人构架区中。

[0096] 上文描述的抗 hTSLPR 抗体可在可变区和恒定区进行非严格的氨基酸替代、添加或缺失，而不丢失结合特异性或效应功能，或结合亲和力的极度降低。一般，整合此类改变的抗体与它们起源的参照抗体显示基本的序列同一性。例如，本发明一些抗 hTSLPR 抗体的成熟轻链可变区与 SEQ.I.D.NO : 8 中描述的抗 hTSLPR 抗体的成熟轻链可变区的序列具有至少 75% 或至少 85%（例如至少 90%，如 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）的序列同一性。类似地，所述抗体的成熟重链可变区通常显示与 SEQ.I.D.NO : 7 中描述的抗 hTSLPR 抗体的成熟重链可变区的序列至少 75% 或至少 85%（例如至少 90%，如 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）的序列同一性。

[0097] 2. 人抗 hTSLPR 抗体

[0098] 本发明还包括的是完全人抗体，其显示相同的结合特异性和可比较的或更高的结合亲和力。例如，人抗体相对于含有 SEQ ID NO : 7 的重链可变区序列和 SEQ ID NO : 8 的轻链可变区序列的参照抗体具有相同或更好的结合特性。相比于嵌合抗体或人源化抗体，当向人受试者施用，本发明的人抗 hTSLPR 抗体具有进一步降低的抗原性。

[0099] 可使用本领域已知的方法产生人抗 hTSLPR 抗体。例如，在美国专利申请序列号 10/778,726 (公布号 20050008625) 中已经公开了在抗体中用人可变区替换非人抗体可变区，同时相对于非人抗体维持相同的结合特性或提供更好的结合特性的体内方法。所述方法依赖于用完全人抗体对非人参照抗体可变区的表位指导的替换。所得人抗体一般与参照非人抗体在结构上不相关，但与参照抗体结合相同抗原上的相同表位。简言之，如下进行连续表位指导的互补替换方法：在细胞中在“竞争者”与参照抗体（“测试抗

体”)多种杂合体库之间建立对在响应测试抗体结合抗原的报告系统存在下结合有限量抗原的竞争。所述竞争者可以是参照抗体或其衍生物,如单链 Fv 片段。所述竞争者也可以是抗原的天然或人工配体,其与参照抗体结合相同的表位。竞争者的唯一要求是其与参照抗体结合相同的表位,并且与参照抗体竞争抗原结合。所述测试抗体具有来自非人参照抗体的一个共同的抗原结合 V 区,和随机选自不同来源如人抗体所有组成成分库的其它 V 区。来自参照抗体的共同 V 区作为向导起作用,使所述测试抗体定位在抗原的同一表位上并且是同一方向,使得选择偏向对参照抗体最高的抗原结合保真性。

[0100] 许多类型的报告系统可用于检测测试抗体与抗原之间的想要的相互作用。例如,补体报告片段可分别连接抗原和测试抗体,使得仅当所述测试抗体结合抗原时发生片段互补引起的报告子激活。当测试抗体与抗原报告片段融合与竞争者共表达时,报告子激活变得依赖所述测试抗体与竞争者竞争的能力,其与所述测试抗体对抗原的亲合力成比例。可以使用的其它报告系统包括如美国专利申请序列号 10/208,730(公布号 20030198971)中公开的自抑制报告重激活系统(RAIR)的再生器,或在美国专利申请序列号 10/076,845(公布号 20030157579)中公开的竞争性激活系统。

[0101] 利用连续表位引导的互补性置换系统,进行选择以鉴定表达单个测试抗体与竞争者、抗原和报告组分的细胞。在这些细胞中,每一测试抗体与竞争者一对一竞争结合有限量的抗原。报告子的活性与结合测试抗体的抗原的量成比例,其又与所述测试抗原对抗原的亲合力和所述测试抗体的稳定性成比例。当表达为测试抗体时,在相对于参照抗体活性的活性基础上开始选择测试抗体。第一轮选择的结果是一组“杂合”抗体,每一抗体包含来自参照抗体的相同非人 V 区和来自文库的人 V 区,并且每一抗体与参照抗体结合抗原上的同一表位。在第一轮中选择的多种杂合抗体之一将对抗原具有亲合力,所述亲合力可与参照抗体的亲合力相当或比参照抗体的亲合力更高。

[0102] 在第二个 V 区置换步骤中,第一步中选择的人 V 区用作指导以选择用同源人 V 区的不同文库对剩余非人参照抗体 V 区进行人置换。在第一轮中选择的杂合抗体也可用作第二轮选择的竞争者。第二轮选择的结果是一组完全人抗体,其在结构上不同于参照抗体,但与参照抗体竞争结合同一抗原。一些所选择的人抗体与参照抗体结合同一抗原上的同一表位。在这些所选择的人抗体中,一个或更多个人抗体以与参照抗体亲合力相当或比其高的亲合力结合同一表位。

[0103] 如参照抗体,使用上述一个小鼠或嵌合抗-hTSLPR 抗体,可容易地使用该方法来产生以相同结合特异性和相同或更高结合亲合力结合人 TSLPR 的人抗体。此外,也可通过商业途径从通常产生人抗体的公司,例如 KaloBios, Inc.(Mountain View, CA)获得此类人抗-hTSLPR 抗体。

[0104] 4. 其它类型的抗 hTSLPR 抗体

[0105] 本发明的抗 hTSLPR 抗体也包括单链抗体、双特异性抗体和多特异性抗体。在一些实施方案中,本发明的抗体是单链抗体。单链抗体在单条稳定折叠的多肽链中含有来自重链和轻链的抗原结合区。像这样,单链抗体通常保留单克隆抗体的结合特异性和亲合力,但具有比典型的免疫球蛋白小很多的大小。对于某些应用,本发明的抗 hTSLPR 单链抗体与完整的抗 hTSLPR 抗体相比可提供许多有利的性质。当与基于小鼠的抗体相比时,这些包括,例如从身体更快的清除、对诊断成像和治疗而言更高的组织穿透力和

免疫原性的显著降低。使用单链抗体的其它潜在益处包括在高通量筛选方法中增强的筛选功能和用于非肠胃外应用的潜力。

[0106] 可使用已经在本领域中描述的方法制备本发明的单链抗 hTSLPR 抗体。此类技术的实例包括在美国专利号 4,946,778 和 5,258,498；Huston 等，*Methods in Enzymology* 203：46-88，1991；Shu 等，*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*90：7995-7999，1993；和 Skerra 等，*Science* 240：1038-1040，1988 中描述的那些。

[0107] 在一些实施方案中，本发明提供衍生自或连接到另一功能分子上的抗 hTSLPR 抗体，以产生双特异性或多特异性分子，其结合多个结合位点或靶表位。所述功能分子包括另一肽或蛋白质（例如，细胞因子、细胞毒素剂、免疫刺激剂或抑制剂、Fab' 片段或如上讨论的其它抗体结合片段）。例如，抗 hTSLPR 抗体或其抗原结合部分可在功能上连接（例如通过化学偶联、遗传融合、非共价连接或其它）一个或更多个其它结合分子，如另一抗体、抗体片段、肽或结合模拟物。因此，本发明的双特异性抗体和多特异性抗 hTSLPR 抗体包含至少一个单克隆抗 hTSLPR 抗体或其抗原结合片段，其对 hTSLPR 具有第一结合特异性，并对第二个靶表位具有第二结合特异性。第二个靶表位可以是 Fc 受体，例如人 Fc γ RI 或人 Fc γ 受体。因此，本发明包括双特异性和多特异性分子，其能够结合表达 Fc γ R1、Fc γ R 或 Fc ϵ R 的效应细胞（例如单核细胞、巨噬细胞或多形核细胞 (PMNs)），和表达 hTSLPR 的靶细胞（例如人 CD11c⁺ 树突细胞）。这些多特异性（例如，双特异性或多特异性）分子将 hTSLPR 表达细胞靶向效应细胞，并触发 Fc 受体介导的效应细胞活性，如 hTSLPR 表达细胞的吞噬、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)、细胞因子释放或超氧化物负离子产生。

[0108] 可通过本领域已经描述的方法制备本发明的双特异性和多特异性抗 hTSLPR 分子。这些包括化学技术（参阅，例如 Kranz，*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 78：5807，1981）、多瘤 (polydoma) 技术（参阅例如美国专利号 No.4,474,893）或重组 DNA 技术。也可使用本领域已知的和此处描述的方法，通过缀合组分结合特异性，例如抗 FcR 和抗 hTSLPR 结合特异性来制备本发明的双特异性和多特异性分子。例如，可分别产生双特异性和多特异性分子各自的结合特异性，然后将彼此缀合。当所述结合特异性是蛋白质或肽时，多种偶联剂或交联剂可用于共价缀合。交联剂的实例包括 A 蛋白、碳二亚胺、N-琥珀酰-S-乙酰基-硫代乙酸酯 (SATA)、N-琥珀酰-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯 (SPDP) 和磺基琥珀酰-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯 (磺基 SMCC)。当所述结合特异性是抗体时（例如两个人源化抗体），可经两条重链的 C 末端铰链区的巯基键合将它们缀合。在缀合前可修饰铰链区以含有奇数个巯基，例如一个。

[0109] 可通过酶联免疫吸附测定 (ELISA)、放射免疫测定 (RIA) 或 Western 印迹测定来验证双特异性和多特异性分子与其特异性靶标的结合。每一这些测定一般通过使用对目的复合体特异的经标记试剂（例如抗体）检测特定目的蛋白质-抗体复合体的存在。例如，可使用例如识别并特异性结合抗体-FcR 复合体的酶联抗体或抗体片段检测 FcR-抗体复合体。或者，可使用多种其它免疫测定中的任何一种检测所述复合体。例如，抗体可被放射性标记并用于放射免疫测定 (RIA)（参阅，例如 Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986*）。可通过如使用 γ 计数器或闪烁计数器或通过放射自

显影这样的手段来检测放射性同位素。

[0110] III. 用于制备抗 hTSLPR 抗体的多核苷酸、载体和宿主细胞

[0111] 本发明提供基本纯化的多核苷酸 (DNA 或 RNA)，其编码包含上述抗 hTSLPR 抗体链的区段或结构域的多肽。本发明的一些多核苷酸包含 SEQ ID NO：9 中所示重链可变区的核苷酸序列和 / 或 SEQ ID NO：10 中所示轻链可变区的核苷酸序列。本发明的一些其它多核苷酸包含核苷酸序列，其与 SEQ ID NO：9、10、21 或 22 的核苷酸序列基本相同 (例如至少 65%、80%、95% 或 99% 同一性)。当从适当表达载体进行表达时，这些多核苷酸编码的多肽能够显示抗原结合能力。

[0112] 本发明还提供的是多核苷酸，其编码至少一个 CDR 区和来自上述抗 hTSLPR 抗体的重链或轻链的通常全部三个 CDR 区。一些其它多核苷酸编码上述抗 hTSLPR 抗体的重链和 / 或轻链的全部或基本上全部可变区序列。例如，这些多核苷酸中的一些编码 SEQ ID NO：7 中所示重链可变区的氨基酸序列和 / 或 SEQ ID NO：8 中所示轻链可变区的氨基酸序列。或者，这些多核苷酸中的一些编码 SEQ ID NO：21 中所示重链可变区的氨基酸序列和 / 或 SEQ ID NO：22 中所示轻链可变区的氨基酸序列。因为密码子的简并，多种核酸序列将编码各自的免疫球蛋白氨基酸序列。

[0113] 本发明的多核苷酸可仅编码抗 hTSLPR 抗体的可变区序列。它们还可编码所述抗体的可变区和恒定区。本发明核酸的一些多核苷酸序列编码成熟的重链可变区序列，其与在 SEQ.I.D.NO：7 或 21 中所述的成熟的重链可变区序列基本相同 (例如，至少 80%、90% 或 99%)。一些其它多核苷酸序列编码成熟的轻链可变区序列，其与在 SEQ.I.D.NO：8 或 22 中所述的成熟的轻链可变区序列基本相同 (例如，至少 80%、90% 或 99%)。一些多核苷酸序列编码包含小鼠抗体重链和轻链的可变区的多肽。一些其它多核苷酸编码分别与小鼠抗体的重链和轻链的可变区基本相同的两个多肽区段。

[0114] 可通过从头固相 DNA 合成或通过编码抗 hTSLPR 抗体或其结合片段的现有序列 (例如在下文实施例中描述的序列) 的 PCR 诱变产生多核苷酸序列。核酸的直接化学合成可通过本领域已知的方法完成，所述方法如 Narang 等，1979, Meth.Enzymol.68：90 的磷酸三酯法；Brown 等，Meth.Enzymol.68：109, 1979 的磷酸二酯法；Beaucage 等，Tetra.Lett., 22：1859, 1981 的二乙基亚磷酰胺法；和美国专利号 4,458,066 的固相支持体法。例如在 PCR Technology：Principles and Applications for DNA Amplification, H.A.Erlich (编辑)，Freeman Press, NY, NY, 1992；PCR Protocols：A Guideto Methods and Applications, Innis et al.(编辑)，Academic Press, San Diego, CA, 1990；Mattila 等，Nucleic Acids Res.19：967, 1991；和 Eckert 等，PCRMethods and Applications 1：17, 1991 中描述，可通过 PCR 向多核苷酸序列引入突变。

[0115] 本发明还提供的是用于制备如上所述抗 hTSLPR 抗体的表达载体和宿主细胞。可使用多种表达载体表达编码抗 TSLPR 抗体链或结合片段的多核苷酸。可使用基于病毒的载体和非病毒表达载体在哺乳动物宿主细胞中产生抗体。非病毒载体和系统包括通常具有表达蛋白质或 RNA 的表达盒的质粒、附加型载体，和人类的人工染色体 (参阅例如 Harrington 等，NatGenet 15：345, 1997)。例如，用于在哺乳动物 (例如，人) 细胞中表达抗 hTSLPR 多核苷酸和多肽的非病毒载体包括 pThioHis A, B & C、pcDNA3.1/His、pEBVHis A, B & C, (Invitrogen, San Diego, CA)、MPSV 载体和本领域已知用于表达

其它蛋白质的许多其它载体。有用的病毒载体包括基于逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒的载体、基于 SV40、乳头瘤病毒、HBP Epstein Barr 病毒、痘苗病毒载体和 semliki 病毒 (SFV) 的载体。参阅, Brent 等, 上文; Smith, *Annu.Rev.Microbiol.*49: 807, 1995; 和 Rosenfeld 等, *Cell* 68: 143, 1992。

[0116] 表达载体的选择取决于其中待表达所述载体的期望的宿主细胞。通常, 表达载体含有启动子和其它调节序列 (例如, 增强子), 其有效连接编码抗 hTSLPR 抗体链或片段的多核苷酸。在一些实施方案中, 诱导型启动子用于防止插入序列的表达, 除了在诱导条件下。诱导型启动子包括, 例如阿拉伯糖、lacZ、金属硫蛋白启动子或热激启动子。可在非诱导条件下扩大转化生物的培养, 而不使群体偏向编码序列, 其中所述编码序列的表达产物被宿主细胞更好地耐受。除了启动子, 有效表达抗 hTSLPR 抗体链或片段也需要或期望其它调节元件。这些元件通常包括 ATG 起始密码子和相邻的核糖体结合位点或其它序列。此外, 可通过包含对使用的细胞系统合适的增强子来增强表达效率 (参阅, 例如 Seharf 等, *Results Probl.Cell Differ.*20: 125, 1994; 和 Bittner 等, *Meth. Enzymol.*, 153: 516, 1987)。例如, SV40 增强子或 CMV 增强子可用于增强哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0117] 表达载体还提供分泌信号序列位置, 以与插入的抗 hTSLPR 抗体序列编码的多肽形成融合蛋白。更经常的是, 所述插入的抗 hTSLPR 抗体序列在包含在载体之前连接信号序列。待用于接受编码抗 hTSLPR 抗体轻链和重链可变域的序列的载体有时候也编码恒定区或其部分。此类载体允许可变区表达为与恒定区的融合蛋白, 由此导致产生完整抗体或其片段。通常, 此类恒定区是人恒定区。

[0118] 用于包含并表达抗 hTSLPR 抗体链的宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞。大肠杆菌 (*E.coli*) 是用于克隆并表达本发明多核苷酸的一种原核宿主。适合使用的其它微生物宿主包括芽孢杆菌, 如枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和其它肠杆菌科, 如沙门氏菌 (*Salmonella*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*) 和多种假单胞菌种。在这些原核宿主中, 也可以制备表达载体, 其通常含有与所述宿主细胞相容的表达控制序列 (例如复制起点)。此外, 将存在任何数量的多种众所周知的启动子, 如乳糖启动子系统、色氨酸 (*trp*) 启动子系统、 β 内酰胺酶启动子系统或来自 λ 噬菌体的启动子系统。启动子通常任选地与操纵基因序列一起控制表达, 并具有核糖体结合位点序列等, 用于起始和终止转录和翻译。其它微生物, 如酵母也可用于表达本发明的抗 hTSLPR 多肽。还可使用昆虫细胞与杆状病毒载体的组合。

[0119] 在一些优选的实施方案中, 哺乳动物宿主细胞用于表达并制备本发明的抗 hTSLPR 多肽。例如, 它们可以是表达内源免疫球蛋白基因的杂交瘤细胞系 (例如, 如实施例中描述的 1D6.C9 骨髓瘤杂交瘤克隆) 或包含外源表达载体的哺乳动物细胞系 (例如下文示例的 SP2/0 骨髓瘤细胞)。这些包括任何正常死亡的或正常的或异常永生的动物或人细胞。例如, 已经开发了能够分泌完整免疫球蛋白的许多合适的宿主细胞系, 包括 CHO 细胞系、多种 Cos 细胞系、Hela 细胞、骨髓瘤细胞系、转化的 B 细胞和杂交瘤。通常在例如 Winnacker, *FROM GENES TO CLONES*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987 中讨论了哺乳动物组织细胞培养表达多肽的用途。用于哺乳动物宿主细胞的表达载体可包括表达控制序列, 如复制起点、启动子和增强子 (参阅, 例如 Queen, 等, *Immunol.Rev.*89:

49-68, 1986), 和必要的加工信息位点, 如核糖体结合位点、RNA 剪接位点、多腺苷酸化位点和转录终止序列。这些表达载体通常含有来自哺乳动物基因或哺乳动物病毒的启动子。合适的启动子可以是组成型的、细胞类型特异的、阶段特异的和 / 或可调整或可调节的。有用的启动子包括, 但不限于金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导的 MMTV 启动子、SV40 启动子、MRP polIII 启动子、组成型 MPSV 启动子、四环素诱导的 CMV 启动子 (如人立即 - 早期 CMV 启动子)、组成型 CMV 启动子和本领域已知的启动子 - 增强子组合。

[0120] 用于引入含有目的多核苷酸序列的表达载体的方法根据细胞宿主的类型不同而不同。例如, 氯化钙转染通常用于原核细胞, 而磷酸钙处理或电穿孔可用于其它细胞宿主。(一般参阅 Sambrook, 等, 上文)。其它方法包括, 例如电穿孔、磷酸钙处理、脂质体介导的转化、注射和显微注射、生物射弹方法、病毒体、免疫脂质体、聚阳离子: 核酸缀合物、裸露 DNA、人工病毒体、与疱疹病毒结构蛋白 VP22 的融合物 (Elliot 和 O' Hare, Cell88 : 223, 1997)、DNA 的试剂增强的吸收和离体转导。对重组蛋白质的长期高产量制备, 经常需要稳定表达。例如, 可使用含有病毒复制起点或内源表达元件和可选择标记基因的本发明表达载体制备稳定表达抗 hTSLPR 抗体链或结合片段的细胞系。引入载体后, 在转到选择培养基中之前允许细胞在富集培养基中生长 1-2 天。所述可选择标记的目的是赋予选择抗性, 并且其存在允许成功表达引入序列的细胞在选择培养基中生长。使用细胞类型合适的组织培养技术可以增殖稳定转染的抗性细胞。

[0121] IV. 抗 hTSLPR 抗体的性质

[0122] 一旦上述抗 hTSLPR 抗体在宿主细胞中从表达载体表达或在杂交瘤中内源表达, 就可容易地从培养基和宿主细胞中纯化它们。一般, 抗体链与信号序列一起表达, 并因此释放到培养基中。然而, 如果抗体链不是宿主细胞天然分泌的, 可用温和的去污剂进行处理来释放所述抗体链。然后可通过常规方法, 包括硫酸铵沉淀法、与固定靶标的亲和层析、柱层析、凝胶电泳等释放抗体链。这些方法是众所周知的并通常实践于本领域中, 例如 Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, NY, 1982 ; 和 Harlow & Lane, 上文。

[0123] 作为实例, 表达本发明抗 hTSLPR 抗体的所选杂交瘤可在两升旋转烧瓶中生长用于单克隆抗体的纯化。可过滤上清液并进行浓缩后用 A 蛋白 - 琼脂糖或 G 蛋白 - 琼脂糖 (Pharmacia, Piscataway, NJ) 进行亲和层析。可通过凝胶电泳和高效液相层析检查洗脱的 IgG, 以保证纯度。可将缓冲液交换到 PBS 中, 并通过 OD280 读数测定浓度。可将单克隆抗体等分并储存于 -80°C 。

[0124] 不考虑其制备方法, 本发明的抗 hTSLPR 单克隆抗体特异性结合 hTSLPR 或其抗原片段。当抗体结合 hTSLPR 或其抗原片段的解离常数 $\leq 1 \mu\text{M}$, 优选 $\leq 100\text{nM}$, 并最优选 $\leq 1\text{nM}$ 时存在特异性结合。可通过直接标记目的抗体检测抗体结合 hTSLPR 的能力, 或者可以不标记所述抗体, 并使用多种夹层测定形式间接检测结合。参阅, 例如, Harlow & Lane, 上文。具有这样结合特异性的抗体更可能共有下文实施例中讨论的 1D6.C9 小鼠抗 hTSLPR 抗体显示的有利性质。

[0125] 本发明的抗 TSLPR 单克隆抗体能够拮抗 TSLP 介导的信号转导活性。这些活性包括, 例如树突细胞如 TARC 和 MDC 分泌 $\text{T}_{\text{H}}2$ - 吸引趋化因子; 树突细胞的激活、初生

CD4+T 细胞扩大并极化成 T_H2 表型、促过敏性细胞因子如 IL-4、IL-5、IL-13 TNF α 的产生。许多测定可用于确定抗 hTSLPR 抗体是否能抑制 TSLP 介导的细胞活性。这些包括,例如实施例中描述的任何测定,如使用 Ba/F3/hTSLPR/hIL7R α 细胞的细胞增殖测定、使用 Ba/F3/hTSLPR/IL7R α /Stat5-Luc 细胞的萤光素酶报告测定,和 TARC 分泌测定。也已经在本领域中描述了用于测定 TSLP 信号转导活性的额外测定法。参阅例如, Reche 等, *J.Immunol.*, 167 : 336-43, 2001 ; 和 Isaksen 等, *J.Immunol.*168 : 3288-94, 2002。

[0126] 在一些实施方案中,本发明的抗 hTSLPR 抗体阻断或竞争结合具有 SEQ. I.D.NO : 7 中所述可变区序列的参照抗 hTSLPR 抗体并结合 hTSLPR 多肽。这些可以是上述完全人抗 hTSLPR 抗体。它们也可以是其它小鼠、嵌合或人源化抗 hTSLPR 抗体,其与参照抗体结合相同的表位。阻断或与参照抗体结合竞争的能力表明测试中的抗 hTSLPR 抗体结合与参照抗体定义的表位相同或类似的表位,或结合与参考抗 hTSLPR 抗体结合的表位足够相近的表位。此类抗体尤其可能共有为参照抗体鉴定的有利性质。可通过例如竞争结合测定确定阻断或与参照抗体竞争的能力。利用竞争结合测定,检测测试中的抗体抑制参照抗体与共同抗原如 TSLPR 多肽特异性结合的能力。如果过量测试抗体实质抑制参照抗体的结合,那么测试抗体与所述参照抗体竞争对抗原的特异性结合。实质抑制表示所述测试抗体将参照抗体的特异性结合通常降低至少 10%、25%、50%、75% 或 90%。

[0127] 有许多已知竞争结合测定,其可用于评估抗 hTSLPR 抗体与参照抗 hTSLPR 抗体竞争结合人 TSLPR。这些包括,例如固相直接或间接放射免疫测定 (RIA)、固相直接或间接酶免疫测定 (EIA)、夹层竞争测定 (参阅 Stahli 等, *Methods in Enzymology* 9 : 242-253, 1983) ; 固相直接生物素-亲和素 EIA (参阅 Kirkland 等, *J.Immunol.*137 : 3614-3619, 1986) ; 固相直接标记测定、固相直接标记夹层测定 (参阅 Harlow & Lane, 上文) ; 使用 I-125 标记的固相直接标记 RIA (参阅 Morel 等, *Molec.Immunol.*25 : 7-15, 1988) ; 固相直接生物素-亲和素 EIA (Cheung 等, *Virology* 176 : 546-552, 1990) ; 和直接标记的 RIA (Moldenhauer 等, *Scand.J.Immunol.*32 : 77-82, 1990)。通常,这种测定涉及使用结合固相表面或携带未标记测试抗 hTSLPR 抗体和标记的参照抗体任一种的细胞的纯化抗原。通过测定在测试抗体存在下结合到固相表面或细胞上的标记的量来测定竞争性抑制。通常所述测试抗体过量存在。通过竞争测定 (竞争抗体) 鉴定的抗体包括与参照抗体结合相同表位的抗体和由于发生位阻而结合与参照抗体结合的表位十分接近的相邻表位的抗体。

[0128] 为了测定所选抗 TSLPR 单克隆抗体是否结合唯一的表位,可使用市售试剂 (例如来自 Pierce, Rockford, IL 的试剂) 将各抗体生物素化。可使用 TSLPR 多肽包被的 ELISA 平板进行使用未标记单克隆抗体和生物素化单克隆抗体的竞争研究。可用链霉抗生素蛋白-碱性磷酸酶探针检测生物素化的 MAb 结合。为了测定纯化的抗 TSLPR 抗体的同种型,可进行同种型 ELISA。例如,可用 1 μ g/ml 抗人 IgG 包被微量滴定板的孔,于 4 $^{\circ}$ C 过夜。用 1% BSA 封闭后,所述平板与 1 μ g/ml 或更少量的单克隆抗 hTSLPR 抗体或纯化的同种型对照在室温下反应 1 到 2 小时。所述孔然后与人 IgG1 或人 IgM 特异性碱性磷酸酶-缀合探针反应。然后将平板显影并分析,使得可测定所述纯化抗体的同种

型。

[0129] 为了显示单克隆抗 hTSLPR 抗体与表达 hTSLPR 多肽的活细胞的结合，可使用流式细胞术。简言之，表达 hTSLPR 的细胞系（在标准生长条件下生长）可与多种浓度的抗 hTSLPR 抗体在含有 0.1% BSA 和 10% 胎牛血清的 PBS 中混合，并在 37°C 温育 1 小时。洗涤后，细胞与荧光素标记的抗人 IgG 抗体在与一级抗体染色相同的条件下反应。可通过 FACSscan 仪器使用光和侧散射性质门控单个细胞来分析样品。（除了或代替）流式细胞测定，可使用利用荧光显微术的备选测定法。可如上述将细胞精确染色并通过荧光显微术检查。该方法允许目测各细胞，但根据抗原的密度可能降低了灵敏度。

[0130] 可通过 Western 印迹进一步检测本发明抗 hTSLPR 抗体与 hTSLPR 多肽或抗原片段的反应性。简言之，可制备纯化的 hTSLPR 多肽或融合蛋白，或来自表达 TSLPR 的细胞的细胞提取物并进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后，将分离的抗原转移到硝酸纤维素膜上，用 10% 胎牛血清封闭，并用待检测的单克隆抗体探测。可使用抗人 IgG 碱性磷酸酶检测人 IgG 结合并用 BCIP/NBT 底物片剂 (Sigma Chem.Co., St.Louis, MO) 显色。

[0131] V. 非免疫球蛋白支架

[0132] 可使用多种抗体 / 免疫球蛋白构架或支架，只要所得多肽包括对靶蛋白特异的至少一个结合区。此类构架或支架包括人类免疫球蛋白的 5 个主要同种型，或其片段（如本文其它地方公开的那些），并包括其它动物种的免疫球蛋白，优选具有人源化方面。单条重链抗体如在 camelids 中鉴定的那些抗体在该方面具有特别重要性。本领域技术人员继续发现并开发新的构架、支架和片段。

[0133] 在一方面，本发明涉及使用其上可移植本发明 CDR 的非免疫球蛋白支架产生基于非免疫球蛋白的抗体。可使用已知的或将来的非免疫球蛋白构架和支架，只要它们包含对靶蛋白特异的结合区。此类化合物此处称为“包含靶特异性结合区的多肽”。已知的非免疫球蛋白构架或支架包括，但不限于 Adnectins (纤连蛋白) (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA)、锚蛋白 (Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland)、结构域抗体 (Domantis, Ltd (Cambridge, MA) 和 Ablynx nv (Zwijnaarde, Belgium))、lipocalin (Anticalin) (Pieris Proteolab AG, Freising, Germany)、小模块免疫药物制剂 (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA)、maxybodies (Avidia, Inc. (Mountain View, CA))、A 蛋白 (Affibody AG, Sweden) 和 affilin (γ 晶体蛋白或泛素) (Scil Proteins GmbH, Halle, Germany)。

[0134] (i) Adnectins- 化合物治疗

[0135] Adnectin 支架基于纤连蛋白类型 III 结构域（例如，纤连蛋白类型 III 的第 10 个模块 (10 Fn3 结构域)）。纤连蛋白类型 III 结构域具有在两个 β 片层之间分布的 7 或 8 个 β 折叠链，其自身彼此包裹以形成蛋白质的核心，并进一步含有将 β 折叠链相互连接并暴露于溶剂的环（类似于 CDR）。在 β 片层的各自边缘具有至少 3 个这样的环，其中所述边缘是与 β 折叠链方向垂直的蛋白质的边界 (US 6,818,418)。

[0136] 这些基于纤连蛋白的支架不是免疫球蛋白，尽管全部折叠与最小功能抗体片段重链可变区（其在骆驼和驼马 IgG 中包含完整的抗原识别单位）的折叠非常相近。因为该结构，所述非免疫球蛋白抗体模拟自然界中类似的抗原结合特性和对那些抗体的亲和

力。这些支架可用于体外环随机化和穿梭策略，其与体内抗体的亲和成熟过程类似。这些基于纤连蛋白的分子可用作支架，其中可使用标准克隆技术将所述分子的环区置换为本发明的 CDR。

[0137] (ii) 锚蛋白 - 分子配偶体

[0138] 该技术基于使用具有锚蛋白来源重复模块的蛋白质作为携带可用于结合不同靶标的可变区的支架。所述锚蛋白重复模块为两个反向平行的 α -螺旋和 β -转角组成的 33 个氨基酸多肽。通过使用核糖体展示最佳优化可变区的结合。

[0139] (iii) Maxybodies/Avimers-Avidia

[0140] Avimer 来自含有天然 A 结构域的蛋白质如 LRP-1。这些结构域天然地用于蛋白质-蛋白质相互作用，并且在人类中超过 250 种蛋白质结构上基于 A 结构域。Avimer 由通过氨基酸接头连接许多不同的“A 结构域”单体 (2-10) 组成。可使用在例如 20040175756；20050053973；20050048512；和 20060008844 中描述的方法产生结合靶抗原的 Avimer。

[0141] (vi) A 蛋白 -Affibody

[0142] **Affibody**®亲和配体是由基于 A 蛋白的一个 IgG-结合域的三个螺旋束组成的小且简单的蛋白质。A 蛋白是来自细菌金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的表面蛋白。该支架结构域由 58 个氨基酸组成，其中 13 个氨基酸随机化产生具有大量配体变体的 **Affibody**®文库 (参阅例如 US 5,831,012)。**Affibody**®分子模拟抗体，与抗体 150kDa 的分子量相比，它们具有 6kDa 的分子量。尽管其尺寸小，但 **Affibody**®分子的结合位点与抗体的结合位点类似。

[0143] (v) Anticalins-Pieris

[0144] **Anticalins**®是 Pieris ProteoLab AG 公司开发的产品。它们来自脂笼蛋白，其为通常参与化学敏感的或不溶化合物的生理运输或储存的一大组小且稳定的蛋白质。若干天然脂笼蛋白出现在人组织或体液中。

[0145] 蛋白质结构表明其为免疫球蛋白，在刚性构架上具有高变环。然而，与抗体或其重组片段相比，脂笼蛋白由具有 160 到 180 个氨基酸残基的单条多肽链组成，仅稍微大于单个免疫球蛋白结构域。

[0146] 构成结合口袋的四个环组显示了显著的结构可塑性并容纳多条侧链。所述结合位点因此可在专有方法中改造，以识别具有高亲和力和特异性的不同形状的规定靶分子。

[0147] 脂笼蛋白家族的一种蛋白质 Pieris Brassicae 的后胆色素结合蛋白 (BBP) 已经用于通过诱变四个环组开发 anticalins。描述“anticalins”的专利申请的一个实例是 PCT WO 199916873。

[0148] (vi) Affilin-Scil 蛋白质

[0149] Affilin™分子是设计对蛋白质和小分子具有特异亲和力的小的非免疫球蛋白。可从两个文库中非常快速地选择新 Affilin™分子，所述每一文库均基于不同的人类来源支架蛋白。Affilin™分子不显示出与免疫球蛋白的任何结构同源性。Scil 蛋白使用两个 Affilin™支架，其中一个为 γ 晶体蛋白——人结构眼晶状体蛋白质，另一个是“泛素”超家族蛋白质。人支架均非常小，显示高的温度稳定性，并几乎对 pH 改变和变性剂有抗

性。这种高稳定性主要是由于蛋白质展开的 β 片层结构。 γ 晶体蛋白来源蛋白质的实例描述于 WO200104144, “泛素样”蛋白质的实例描述于 WO2004106368。

[0150] VI. 抗 hTSLPR 抗体的治疗应用

[0151] 抗 hTSLPR 抗体可通过抑制 TSLP 信号转导活性用于许多治疗或预防应用。这些包括治疗 TSLP 信号转导介导的疾病或状况, 如影响 B 细胞发育、T 细胞发育、T 细胞受体基因重排、或 Stat5 转录因子调节的那些疾病或状况。例如, 所述抗 hTSLPR 拮抗剂抗体可用于抑制或降低 T_H2 细胞介导的不想要的免疫反应。具体而言, 它们适合于治疗患有与 TSLP 信号转导相关或由其介导的变应性炎症病征的人类患者。用本发明抗 hTSLPR 抗体易于治疗的变应性炎症性疾病包括, 例如, (1) 哮喘, 一种与气流阻塞和支气管高反应性相关的呼吸道慢性炎症性疾病; (2) 遗传过敏性皮炎, 一种需要长期间断治疗的慢性、加重炎症性皮肤病; 和 (3) 变应性鼻炎, 一种由与特应性连锁的 T_H2 淋巴细胞介导的鼻粘膜的炎症病症。在美国和几个主要的欧洲国家, 预计哮喘、遗传过敏性皮炎和变应性鼻炎的诊断患病率分别从目前 4600 万增长至 2013 年的 5300 万, 从目前的 3170 万增长至 2013 年的 3720 万, 并从目前的 5590 万增长至 2013 年的 6450 万。约 50% 到 80% 患有遗传过敏性皮炎的患者患有或将患有哮喘或变应性鼻炎。

[0152] 目前可得用于治疗变态反应的大多数药物旨在提供症状缓解, 而在可能提供长期疾病调节的免疫调节领域具有相对很少的效果。本发明的抗 hTSLPR 抗体可对患有任何这些变应性疾病的受试者 (尤其是人类患者) 提供新的有效治疗。通过阻止 TSLP 激活 TSLP 受体信号转导途径, 它们可以阻断 T_H2 响应和负责变应性炎症起始和维持的细胞因子的产生。因此该方法在患有遗传过敏性皮炎、哮喘和变应性鼻炎的患者中具有诱导长期治疗效果和疾病修饰益处的潜力。

[0153] 在另一实施方案中, 本发明提供具有至少任何一种上述抗体或功能片段或保守变体, 和其药学上可接受载体或赋形剂的药物组合物。

[0154] 在某些实施方案中, 本发明提供用于治疗与具有受体靶标 hTSLP 的细胞存在相关的病症或状况的方法。所述方法涉及向需要治疗的受试者施用有效量的任一上述药物组合物。在相关实施方案中, 待治疗的所述病症或状况是呼吸系统病症。

[0155] 在另一实施方案中, 待治疗的病症或状况是支气管哮喘, 其为肺部常见的持久性炎症性疾病, 特征在于呼吸道高反应性 (AHR)、粘液过量产生、纤维化和升高的血清 IgE 水平。

[0156] 在另一实施方案中, 待治疗的病症或状况是遗传过敏性 (变应性) 皮炎, 其为儿童中最常见的皮肤病并且特征在于强烈的瘙痒和慢性湿疹斑。

[0157] 在另一实施方案中, 待治疗的病症或状况选自其它炎症性疾病或呼吸道阻塞疾病和病症, 如 COPD、急性肺损伤 (ALI)、急性 / 成人呼吸窘迫综合征 (ARDS)、呼吸困难、过敏性呼吸道炎症、小呼吸道疾病、肺癌、具有镰状红细胞病的患者中的急性胸综合征和肺动脉高血压, 以及作为其它药物治疗, 尤其是其它吸入药物治疗后果的呼吸道高反应性的恶化。

[0158] 在另一实施方案中, 待治疗的病症或状况是无论什么类型或起源的支气管炎, 包括例如急性、花生仁吸入性、卡他性、格鲁布性、慢性或结核性支气管炎。

[0159] 在另一实施方案中, 待治疗的病症或状况包括无论什么类型或起源的肺尘症

(炎性、常见的职业药物疾病，通常伴随慢性或急性呼吸道阻塞，并由反复吸入粉尘引起)，其包括，例如砒土肺、炭肺、石棉沉着病、石末沉着病、驼鸟毛尘肺、肺铁末沉着病、矽肺、烟草中毒和棉尘病。

[0160] 在另一实施方案中，待治疗的病症或状况选自变应性鼻炎（枯草热）和慢性鼻窦炎。

[0161] 在另一实施方案中，待治疗的病症或状况选自皮肤的其它炎性状况，例如牛皮癣或红斑狼疮。

[0162] 在另一实施方案中，待治疗的病症或状况是炎性肠疾病，如溃疡性结肠炎和克隆病。

[0163] 在另一实施方案中，待治疗的病症或状况选自其它纤维变性状况，如系统性硬化、肝纤维化、肺纤维化、特发性肺纤维化或纤维化肺。

[0164] 在另一实施方案中，待治疗的病症或状况是肿瘤复发或转移。已经显示 Th2 细胞因子的抑制增强动物模型中的抗病毒疫苗并可以在 HIV 和其它感染性疾病的治疗中有益 [Ahlers, J.D., 等 Proc Natl Acad Sci USA, 2002]。

[0165] 在另一实施方案中，待治疗的病症或状况是呼吸道病毒感染，其加剧了潜在的慢性状况，如哮喘、慢性支气管炎、COPD、中耳炎和鼻窦炎。所治疗的呼吸道感染可能与继发细菌感染相关，如中耳炎、鼻窦炎或肺炎。

[0166] 在另一实施方案中，待治疗的病症或状况选自其它疾病或状况，尤其是具有炎性成分的疾病或状况，例如，骨与关节的疾病，包括类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎，和其它疾病，如动脉粥样硬化、多发性硬化，和例如移植心脏、肾、肝、肺或骨髓后的急性和慢性同种异体移植排斥。

[0167] 在另一实施方案中，待治疗的病症或状况是内毒性休克、肾小球肾炎、大脑和心肌缺血、阿尔茨海默氏病、囊性纤维化、病毒感染和与其相关的病情恶化、获得性免疫缺陷综合征 (AIDS)、多发性硬化 (MS)、幽门螺旋菌相关的胃炎和癌，尤其是卵巢癌的生长。

[0168] 在另一实施方案中，待治疗的病症或状况是在人中由病毒感染引起的症状，其由人鼻病毒、其它肠道病毒、冠状病毒、疱疹病毒、流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞体病毒或腺病毒引起。

[0169] 根据本发明的治疗可以是对症的或预防性的。

[0170] 可在患有呼吸道炎症或其它炎症状况的动物模型，例如小鼠、大鼠或兔模型中显示本发明试剂在抑制炎症状况，例如炎症呼吸道疾病中的有效性，例如如 Wada 等, J.Exp.Med(1994) 180 : 1135-40 ; Sekido 等, Nature(1993) 365 : 654-57 ; Modelska 等, Am.J.Respir.Crit.Care.Med(1999) 160 : 1450-56 ; 和 Laffon 等 (1999) Am.J.Respir.Crit.Care Med.160 : 1443-49 描述。

[0171] 在另一实施方案中，本发明提供用于鉴定具有 hTSLP 受体的细胞的方法。该方法涉及将细胞与进一步具有可检测标记的上述抗体或抗体片段接触。所述标记是放射性的、荧光的、有磁性的、顺磁的或化学发光的。所述方法还涉及任何上述成像或分离所述标记的细胞。

[0172] 在另一实施方案中，任何上述人或人源化抗体或抗体片段是合成的。

[0173] 在另一实施方案中，本发明提供药物组合物和额外的治疗剂。

[0174] 所述额外的治疗剂可选自抗炎性、支气管舒张、抗组胺或止咳药物，尤其是用于治疗阻塞或炎症呼吸道疾病，如上文提及的那些疾病，例如作为此类药物治疗活性的增强剂，或作为降低此类药物的需要剂量或潜在副作用的手段。本发明的治疗剂可与其它药物在固定药物组合中混合，或其可在其它药物施用之前、同时或之后单独施用。因此，本发明包括上文描述的本发明试剂与抗炎症、支气管舒张、抗组胺或止咳药物的组合，本发明的所述试剂和所述药物在相同或不同药物组合中。

[0175] 合适的抗炎症药物包括类固醇，尤其是糖皮质激素，如布地缩松、beclamethasone dipropionate、丙酸氟地松、环索奈德或糠酸毛他松，或 WO 02/88167、WO 02/12266、WO 02/100879、WO 02/00679(尤其是实施例 3、11、14、17、19、26、34、37、39、51、60、67、72、73、90、99 和 101 中的那些)、WO 03/35668、WO 03/48181、WO 03/62259、WO03/64445、WO 03/72592、WO 04/39827 和 WO 04/66920 中描述的类型固醇；非类固醇类糖皮质激素受体激动剂，如在 DE 10261874、WO 00/00531、WO 02/10143、WO 03/82280、WO 03/82787、WO 03/86294、WO 03/104195、WO 03/101932、WO 04/05229、WO 04/18429、WO 04/19935 和 WO04/26248 中描述的那些；LTB₄ 拮抗剂，如 BIIL 284、CP-195543、DPC11870、LTB₄ 乙醇酰胺、LY 293111、LY 255283、CGS025019C、CP-195543、ONO-4057、SB 209247、SC-53228 和在 US 5451700 中描述的那些；LTD₄ 拮抗剂，包括孟鲁司特、普仑司特、扎鲁司特、安可来、SR2640、Wy-48, 252、ICI 198615、MK-571、LY-171883、Ro 24-5913 和 L-648051；PDE4 抑制剂如西洛司特 (**Ariflo®** GlaxoSmithKline)、罗氟司特 (Byk Gulden)、V-11294A (Napp)、BAY19-8004 (Bayer)、SCH-351591 (Schering-Plough)、阿罗茶碱 (Almirall Prodesfarma)、PD189659/PD168787 (Parke-Davis)、AWD-12-281 (Asta Medica)、CDC-801 (Celgene)、SelCID (TM) CC-10004 (Celgene)、VM554/UM565 (Vernalis)、T-440 (Tanabe)、KW-4490 (Kyowa Hakko Kogyo)，和在 WO 92/19594、WO 93/19749、WO 93/19750、WO 93/19751、WO 98/18796、WO 99/16766、WO 01/13953、WO 03/104204、WO 03/104205、WO 03/39544、WO04/000814、WO 04/000839、WO 04/005258、WO 04/018450、WO 04/018451、WO 04/018457、WO 04/018465、WO 04/018431、WO 04/018449、WO04/018450、WO 04/018451、WO 04/018457、WO 04/018465、WO 04/019944、WO 04/019945、WO 04/045607 和 WO 04/037805 中公开的那些；A_{2A} 激动剂，如在 EP 1052264、EP 1241176、EP 409595A2、WO 94/17090、WO96/02543、WO 96/02553、WO 98/28319、WO 99/24449、WO 99/24450、WO 99/24451、WO 99/38877、WO 99/41267、WO 99/67263、WO 99/67264、WO 99/67265、WO 99/67266、WO 00/23457、WO 00/77018、WO 00/78774、WO 01/23399、WO 01/27130、WO 01/27131、WO 01/60835、WO 01/94368、WO 02/00676、WO 02/22630、WO 02/96462 和 WO 03/086408 中描述的那些；和 A_{2B} 拮抗剂，如在 WO 02/42298 中描述的那些。

[0176] 合适的支气管舒张药物包括抗胆碱能剂或抗毒蕈碱剂，尤其是异丙托溴铵、溴乙东莨菪碱、噻托溴铵盐和 CHF 4226 (Chiesi)，和格隆溴铵，以及在 EP 424021、US

3714357、US 5171744、WO 01/04118、WO 02/00652、WO 02/51841、WO 02/53564、WO 03/00840、WO 03/33495、WO 03/53966、WO 03/87094、WO 04/018422 和 WO 04/05285 中描述的那些；和 β -2 肾上腺素受体激动剂，如沙丁胺醇、间羟异丙肾上腺素、特布他林、沙美特罗、非诺特罗、丙卡特罗，尤其是福莫特罗、carmoterol 及其药学上可接受的盐，和 WO 00/75114 的通式 I 的化合物（游离形式或盐形式或溶剂化物形式），其文件此处引入作为参考，优选其实施例的化合物，尤其是化合物 (5-[(R)-2-(5, 6-二乙基-茛满-2-基氨基)-1-羟基-乙基]-8-羟基-1H-喹啉-2-酮) 及其药学上可接受的盐，以及 WO 04/16601 的通式 I 的化合物（游离形式或盐形式或溶剂化物形式），还有 EP 1440966、JP 05025045、WO 93/18007、WO 99/64035、US 2002/0055651、WO 01/42193、WO 01/83462、WO 02/66422、WO 02/70490、WO 02/76933、WO 03/24439、WO 03/42160、WO 03/42164、WO 03/72539、WO 03/91204、WO 03/99764、WO 04/16578、WO 04/22547、WO 04/32921、WO 04/33412、WO 04/37768、WO 04/37773、WO 04/37807、WO 04/39762、WO 04/39766、WO 04/45618 WO 04/46083、WO 04/80964、EP 1460064、WO 04/087142、WO 04/089892、EP 01477167、US 2004/0242622、US 2004/0229904、WO 04/108675、WO 04/108676、WO 05/033121、WO 05/040103 和 WO 05/044787 的化合物。

[0177] 合适的二元抗炎症和支气管舒张药物包括二元 β -2 肾上腺素激动剂 / 毒蕈碱拮抗剂，如在 US 2004/0167167、WO 04/74246 和 WO 04/74812 中公开的那些。

[0178] 合适的抗组胺药物包括盐酸西替利嗪、醋氨酚、富马酸氯马斯丁、异丙嗪、氯雷他定、地氯雷他定、可他敏和盐酸非索那丁、activastine、阿司咪唑、氮卓斯汀、依巴斯汀、依匹那丁、咪唑斯汀和 tefenadine 以及 JP2004107299、WO 03/099807 和 WO 04/026841 中公开的那些。

[0179] 也可使用本发明治疗剂和抗胆碱能剂或抗毒蕈碱剂、类固醇、 β -2 激动剂、PDE4 抑制剂、多巴胺受体激动剂、LTD4 拮抗剂或 LTB4 拮抗剂的组合。本发明试剂与抗炎药物的其它有用组合是与细胞因子受体，例如 CCR-1、CCR-3、CCR-4、CCR-5、CCR-6、CCR-7、CCR-8、CCR-9 和 CCR10、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5 的其它拮抗剂，尤其是 CCR-5 拮抗剂，如 Schering-Plough 拮抗剂 SC-351125、SCH-55700 和 SCH-D、Takeda 拮抗剂如 N-[[4-[[[6, 7-二氢-2-(4-甲基)-5H-苯并环庚烯-8-基]羰基]氨基]苯基]-甲基]-四氢-N, N-二甲基-2H-吡喃-4-氯化铵 (TAK-770)、US 6166037 (尤其是权利要求 18 和 19)、WO 0066558 (尤其是权利要求 8)、WO 0066559 (尤其是权利要求 9)、WO 04/018425 和 WO 04/026873 中描述的 CCR-5 拮抗剂的那些组合。

[0180] 额外的治疗剂也可选自其它细胞因子结合分子，尤其是其它细胞因子的抗体，特别是与抗 IL4 抗体（如 PCT/EP2005/00836 中描述），抗 IgE 抗体，如 **Xolair®**、抗 IL31 抗体、抗 IL31R 抗体、抗 IL13 抗体（如 WO05/007699 中描述），抗内皮糖蛋白抗体、抗 IL1b 抗体、抗 TSLP 抗体或另一抗 hTSLPR 抗体的组合。

[0181] 可使用本发明的抗 hTSLPR 拮抗剂抗体治疗性和预防性治疗受试者。在治疗应用中，向已被 TSLP 信号转导引起或与其相关的变应性疾病影响的受试者施用包含抗 hTSLPR 拮抗剂抗体（例如，人源化抗 hTSLPR 抗体）的组合物。所述组合物含有足以治

愈，部分阻止，或可检测减缓状况及其并发症进程的量的抗体。在预防应用中，向未患有过敏性炎症病症的患者施用含有单克隆抗 hTSLPR 抗体的组合物。当然，它们针对处于发生变应性炎症病症风险或具有该倾向的受试者。此类应用允许所述受试者提高患者抵抗力或延缓 TSLP 信号转导介导的变应性炎症病症的进展。

[0182] VII. 药物组合物

[0183] 本发明提供包含与药学上可接受载体一起配制的抗 hTSLPR 单克隆抗体（完整的或结合片段）的药物组合物。所述组合物可额外含有适合于治疗或预防给定过敏性病症的其它治疗剂，例如上文指出的已知抗变态反应剂。药物载体增强或稳定所述组合物，或便于所述组合物的制备。药学上可接受的载体包括生理上相容的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。

[0184] 可通过本领域已知的多种方法施用本发明的药物组合物。施用的途径和 / 或方式根据想要的结果而变化。优选通过静脉内、肌内、腹膜内或皮下施用，或向靶位点附近施用。药学上可接受的载体应该适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用（例如，通过注射或输注）。根据施用的途径，可在材料中包被活性化合物，即抗体、双特异性和多特异性分子，以保护所述化合物免受酸的作用和可能会灭活所述化合物的其它天然情况。

[0185] 组合物应该无菌并且是流体。例如，通过包衣如卵磷脂，在分散情况下通过维持需要的颗粒大小并通过使用表面活性剂维持适当的流动性。在许多情况下，优选在组合物中包括等渗剂，例如糖、多元醇如甘露醇或山梨醇，和氯化钠。可通过在组合物中包括延迟吸收的试剂，例如单硬脂酸铝或明胶引起可注射组合物的长期吸收。

[0186] 可根据本领域众所周知的方法制备本发明的药物组合物并进行常规实践。参阅，例如 Remington : The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 第 20 版, 2000 ; 和 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, 编辑, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。优选在 GMP 条件下制备药物组合物。通常，在本发明药物组合物中使用治疗有效剂量或有效剂量的抗 hTSLPR 抗体。通过本领域技术人员已知的常规方法将抗 hTSLPR 抗体配制成药学上可接受的剂量形式。调节剂量方案以提供最佳的期望应答（例如治疗应答）。例如，可施用单次快速浓注，随时间可施用若干分次剂量或可根据治疗情形的紧急程度按比例减少或增加剂量。尤其有利地配制剂量单位形式的肠胃外组合物用于减少剂量的施用和一致性。如此处所用的剂量单位形式指适合作为用于待治疗受试者的单元剂量的物理分离单位；每一单位含有经计算产生想要的治疗效应的预定量的活性化合物和需要的药物载体。

[0187] 可改变本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平，以获得有效实现对特定患者、组合物和施用方式的期望治疗反应而对所述患者没有毒性的活性成分的量。所选剂量水平取决于多种药物代谢动力学因素，包括本发明使用的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性、施用途径、施用时间、使用的特定化合物的排泄速率、治疗的持续时间、用于与使用的特定组合物组合的其它药物、化合物和 / 或材料、被治疗患者的年龄、性别、重量、状况、一般健康和医疗史和类似因素。

[0188] 医师或兽医可以比达到想要的治疗效果所需要的水平低的水平起动药物组合物中使用的本发明抗体的剂量，并逐渐增加剂量直至达到想要的效果。通常，用于治疗此

处所述变应性炎性疾病的本发明组合物的有效剂量根据许多因素而变化，所述因素包括施用手段、靶位点、患者的生理状态（不论所述患者是人或动物）、施用的其它药物和治疗是预防性的还是治疗性的。需要滴定治疗剂量，以优化安全性和有效性。对于抗体施用，剂量范围从约 0.0001 变化至 100mg/kg 宿主体重，并更通常从 0.01 变化至 5mg/kg 宿主体重。例如，剂量可以为 1mg/kg 体重或 10mg/kg 体重，或在 1-10mg/kg 的范围内。示例性治疗方案使得能够每两周施用一次或每月一次或每 3 到 6 个月一次。

[0189] 通常在多个时间施用抗体。单次剂量之间的间隔可以是每周、每月或每年。如通过测定患者中抗 hTSLPR 抗体的血液水平所示，间隔可以是不规则的。在一些方法中，调整剂量以达到 1-1000 μ g/ml 的血浆抗体浓度，并在一些方法中达到 25-300 μ g/ml。或者，抗体可以作为持续释放制剂施用，在该情况下需要频率更低的施用。剂量和频率根据抗体在患者中的半衰期而变化。通常，人源化抗体显示比嵌合抗体和非人抗体更长的半衰期。施用的剂量和频率可根据治疗是预防性的还是治疗性的而变化。在预防性应用中，在长时间里以相对不频繁的间隔施用相对低的剂量。一些患者在其余生继续接受治疗。在治疗性应用中，有时候需要相对短的间隔内相对高的剂量直至疾病的进程减慢或终止，并优选直至所述患者显示疾病症状的部分或完全改善。其后，可对患者施用预防性方案。

[0190] 在前述说明书中，由于它们属于称为 NVP164-1 的抗体，主要参考本发明的实施方案。然而，该说明书的读者可以认为在称为 NVP163-1 的抗体方面特别并个别涵盖所有等同实施方案，并且这样形成可从属于下文所附权利要求的本发明的实施方案。

实施例

[0191] 提供以下实施例以进一步说明本发明但不用于限制其范围。本发明的其它变型对于本领域普通技术人员是显而易见的并包括于所附的权利要求中。

[0192] 1. 酶联免疫吸附测定

[0193] 用于 ELISA 的蛋白质是 hTSLPR/hFc (R&D systems, #981-TR)、hIL7R α /hFc (R&D systems, #306-IR) 或 mTSLPR/hFc (R&D systems#546-TR)。在 4°C 下用 25 μ L 浓度为 5 μ g/ μ L 的各种蛋白质将 Maxisorp 384 孔板 (Nunc, Rochester, NY, #464718) 包被过夜。用 PBS+0.05% Tween20 (PBST) 洗涤包被的平板，用 80 μ L PBS 中 1% 的 BSA 封闭，并再次用 PBST 洗涤。随后将平板连续与 20 μ L HRP 缀合的山羊抗人 IgG、F(ab')₂ 特异性抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, #109-035-097) 和 20 μ L TMB 底物 (KPL, #50-76-05) 温育，并在 650nm 处读取吸光度。在温育之间用 PBST 洗涤平板。见图 1、2、4、5 和 6。

[0194] 2. 报告基因测定 (RGA)

[0195] 稳定表达 hTSLPR/hIL7R α /Stat5-Luc 的鼠 pro-B 细胞系 Ba/F3 细胞用于 RGA。在含 10% FBS 和 10ng/mL hTSLP 的 RPMI-1640 (R&D Systems, #1398-TS/CF) 中维持稳定细胞。用 RPMI-1640+10% FBS 洗涤细胞一次，以 5×10^5 细胞/mL 重悬浮，并按 20 μ L/孔接种至 384 孔平板上于 5% CO₂, 37°C 的组织培养箱中过夜。在加入 10 μ L 的 4x TSLP (4ng/ μ L) 之前，向细胞加入 10 μ L 抗体并在 37°C 温育 1 小时。37°C 温育 6 小时后，向每孔中加入 20 μ L Bright-Glo (Promega, #2620) 并用发光板读数器对平板读数。

见图 3、7 和 8。

[0196] 3. 进一步表征

[0197] 在文件 WO2007/112146 中称为 NV115-3B 的 TSLPR 抗体为 NV115-3B-IgG1 的 Fab 片段。NV-115-3B-IgG1 是 Fab 片段的全长 IgG1。由于其强烈的免疫原性（见下文图 10C）而无法完成 NV-115-3B-IgG1 的各种灵长类药物代谢动力学（PK）研究，阻碍了随后的多剂量毒性研究。发明人推测的在重链及轻链序列中都包含两亚类人种系序列的最初来自 ‘146 的 TSLPR 抗体可能会产生这种免疫原性问题。产生第二代的候选物 NV164-1 以具有单一亚类的重链和单一亚类的轻链。NV164-1 显示出对人 TSLPR 的结合特异性（见图 4）、与猕猴 TSLPR 的交叉反应性（图 5）和体外测定中的相当的生物活性（图 6、7、8 和 9）。随后，将其在灵长类 PK 研究中用低剂量和高剂量检测（图 10A 和 B）。PK 结果显示更高剂量（30mg/kg）产生对潜在免疫原性的耐受，并且更低剂量（5mg/kg）诱导程度远低于 NV115-3B-IgG1 的免疫原性。因此，针对该靶标具有单一亚类的种系序列的改造抗体似乎在免疫原性上具有有益的效果。

[0198] 可在下文的 SEQ.I.D.NO : 1 至 14 中找到 NV164-1 的多种序列信息。

[0199] 可在下文的 SEQ.I.D.NO : 15 至 24 中找到 NV163-1 的多种序列信息。

[0200] 序列信息

[0201]

| 氨基酸序列或多核苷酸 (PN) | 序列鉴定 (SEQ.I.D.NO :) |
|-----------------|---|
| CDRH1, | 1 : SYGMS |
| CDRH2, | 2 : WVNTNTGNPRYAQGFTG |
| CDRH3, | 3 : EGFIRTVVGAAGRFVY |
| CDRL1, | 4 : RASQDIHTRLA |
| CDRL2 | 5 : WASTLQS |
| CDRL3, | 6 : QQYSAYPT |
| 重链可变区 (VH) | 7 : QVQLVQSGSELKkpGASVKVSKASGYTFTSYGMSWVRQAPGQGLEWMGWV NINTGNPRYAQGF TGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREGFI RTVVGAAGRFVYWGQGLVTVSS |
| 轻链可变区 (VL) | 8 : DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDIHTRLAWYQKPGKAPKLLIYW STLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITISSLQPEDFATYYCQQYSAYPTFGQGTK LEIK |

| | |
|---------------------------|--|
| 重链 | <p>9 :</p> <p>MAVWWTLPFLMAAAQGVQAQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSY GMSWVRQAPGQGLEWMGWVNTNTGNPRYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQI SSLKAEDTAVYYCAREGFIRTVVGAAGRFVYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFpEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALpA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLpSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK</p> |
| 轻链 | <p>10 :</p> <p>MSVLTQVLALLLLWLTGTRCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIHT RLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTLQSGVPSRFSGSGSTDFLTISLQPED FATYYCQQYSAYPTFGQGTKLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSpVTKSFNRGEC</p> |
| 编码 SEQ.I.D.NO : 7 的 PN | <p>11</p> <p>CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCAGCGAGCTGAAGAAACCTGGCGCCAGC GTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTCACCAGCTACGGCATG AGCTGGGTGCGGCAGGCTCCAGGACAGGGACTGGAGTGGATGGGCTGGGTG AACACCAACACCGGCAACCCAGATACGCCAGGGCTCACCAGCCGGTTC GTGTTCAGCCTGGACACCAGCGTGTCCACCGCCTACCTGCAGATCAGCAGC CTGAAGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAGGGCTTCATC CGGACCGTGGTGGGAGCCGCCGAAGATTCGTGTACTGGGGCCAGGGCACC CTGGTCACCGTCTCCTCA</p> |
| 编码 SEQ.I.D.NO : 8 的 PN | <p>12</p> <p>GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGAC AGAGTGACCATCACCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCCACACCCGGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCC</p> |
| | <p>AGCACCTGCAGAGCGGCGTGCCAGCCGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGC ACCGACTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTACAGCGCTACCCACCTTCGGCCAGGGCACCAAG CTTGAAATCAAA</p> |

| | |
|------------------------------------|---|
| <p>编码 SEQ.I.D.NO : 9 的 PN</p> | <p>13 ATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCCATTCTGATGGCAGCTGCCAAGGTGTC CAGGCACAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCAGCGAGCTGAAGAAACCTGGC GCCAGCGTGAAGGTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGCTAC GGCATGAGCTGGGTGCGGCAGGCTCCAGGACAGGGACTGGAGTGGATGGGC TGGGTGAACACCAACACCGGCAACCCCAGATACGCCCAGGGCTTACCAGGC CGGTTCGTGTTACGCTGGACACCAGCGTGTCCACCGCTACCTGCAGATC AGCAGCCTGAAGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAGGGC TTCATCCGACCGTGGTGGGAGCCGCCGAAGATTCGTGTACTGGGGCCAG GGCACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTC CCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC TGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCA GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCA GGACTTACTCCCTCAGCAGCGTCTGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGAGAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCG TGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTATAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA</p> |
| <p>编码 SEQ.I.D.NO : 10 的 PN</p> | <p>14 ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCTGGCGTTGCTGCTGCTGTGGCTTACAGGT ACGCGTTGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGC GTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCCACACC CGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATC TACTGGGCCAGCACCTGCAGAGCGGCGTGCCAGCCGGTTAGCGGCAGC GGCTCCGGCACCGACTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGAC TTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCGCCTACCCACCTTCGGCCAG GGCACCAAGCTTGAATCAAAGGAACTGTGGCTCCACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGC CTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGAC TACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGC TCGCCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG</p> |
| <p>CDRH1, NV163-1</p> | <p>15 : SYGIS</p> |
| <p>CDRH2, NV163-1</p> | <p>16 : WVNINTGNPRYAQGFTG</p> |
| <p>CDRH3, NV163-1</p> | <p>17 : EGFIRTVVGAAGRFVY</p> |
| <p>CDRL1, NV163-1</p> | <p>18 : RASQDIHTRLA</p> |

| | |
|----------------------------|--|
| CDRL2, NV163-1 | 19 : WASTRGS |
| CDRL3, NV163-1 | 20 : QQYSAYPT |
| VH, NV163-1 | 21 : <u>QVQLVQSGVSELKPKGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWV</u> <u>NTNTGNPRYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISLKAEDTAVYYCAREGFI</u> <u>RTVVGAAGREVVYWGQTLVTVSS</u> |
| VL, NV163-1 | 22 : <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASODIHLRLAWYQKPKGKAPKLLIYWA</u> <u>STRGSGVPSRFSGSGSDFTLTITSLQPEDFATYYCQQYSAYPTFGQGTK</u> LEIK |
| 编码 SEQ.I.D.NO : 21 的 PN | 23 : CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA GTGAAGGTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTACCAGCTATGGTATC AGTTGGGTGCGACAGGCCCGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGGTC AACACCAACACTGGGAACCAAGGTACGCCAGGGCTTACGGGACGGTTT GTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTCAGTACGGCATATCTGCAGATCAGCAGC CTAAAGGCTGAGGACACTGCCGTGTACTACTGCGCAAGAGAAGGCTTTATT CGTACGGTAGTGGGTGCCGCCGGTCTGTTTTGTGTATTGGGGCCAAGGTACC CTGGTGACCGTGAGCTCC |
| 编码 SEQ.I.D.NO : 22 的 PN | 24 : GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC AGAGTCACCATCACTTGTCTGGGCCAGTCAGGATATTCATACTCGGTTGGCT TGGTACCAGCAGAAACCAGGAAAAGCCCCTAAGCTGCTCATTACTGGGCA TCTACCCGTGGATCCGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAAGTGGATCTGGG ACAGATTTTACTTTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACC TACTACTGCCAGCAGTATAGCGCATATCCGACGTTTGGCCAAGGTACGAAA CTGGAAATTA |

[0202]

[0203]

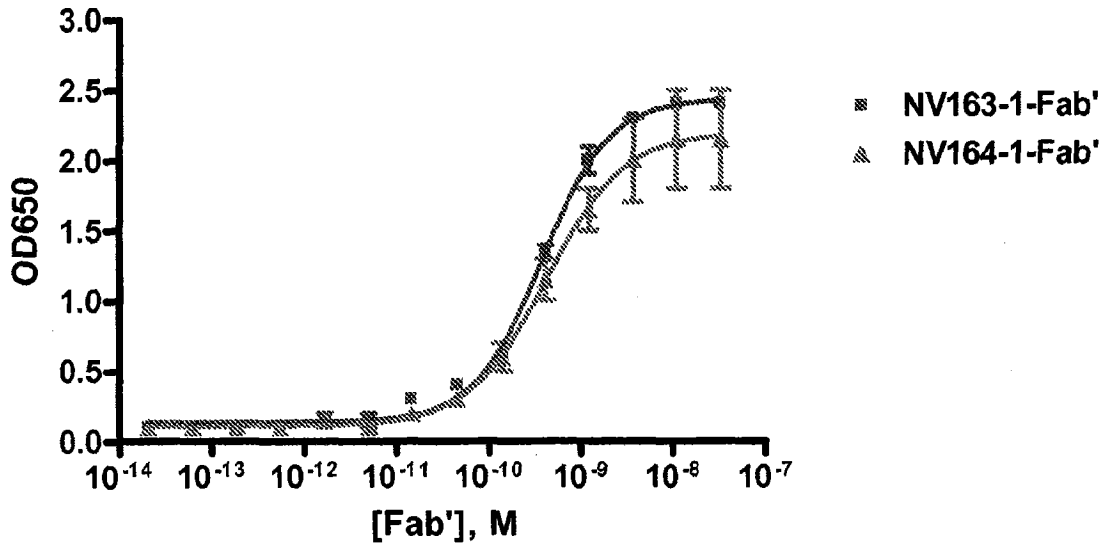


图 1

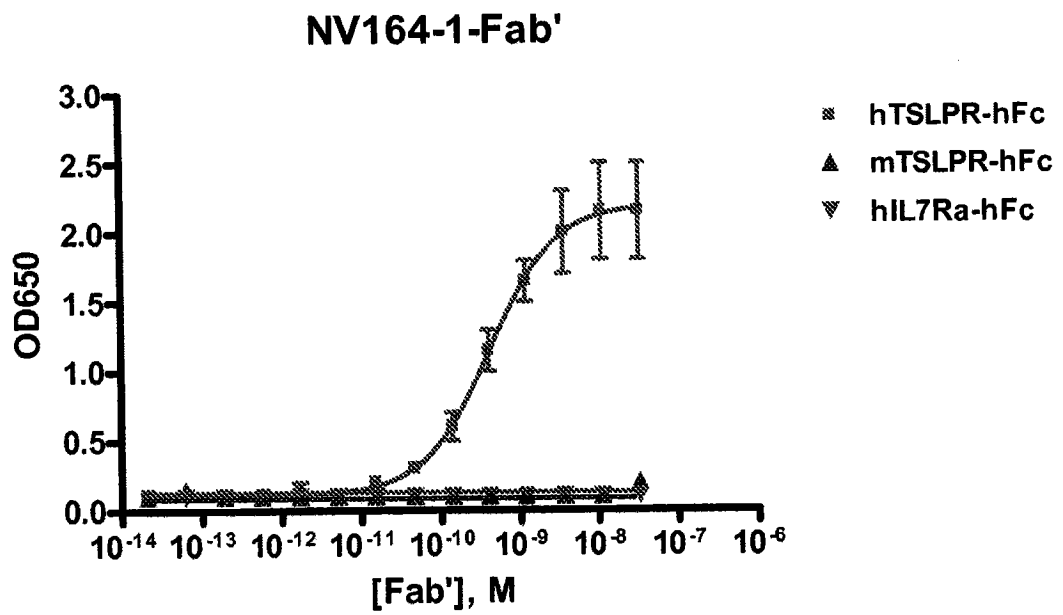
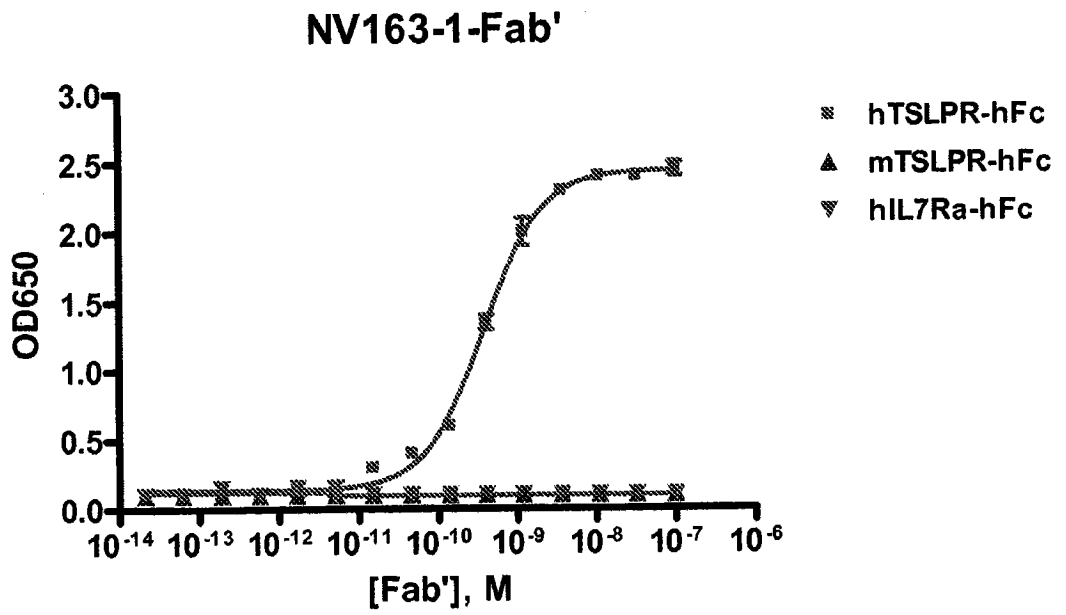


图 2

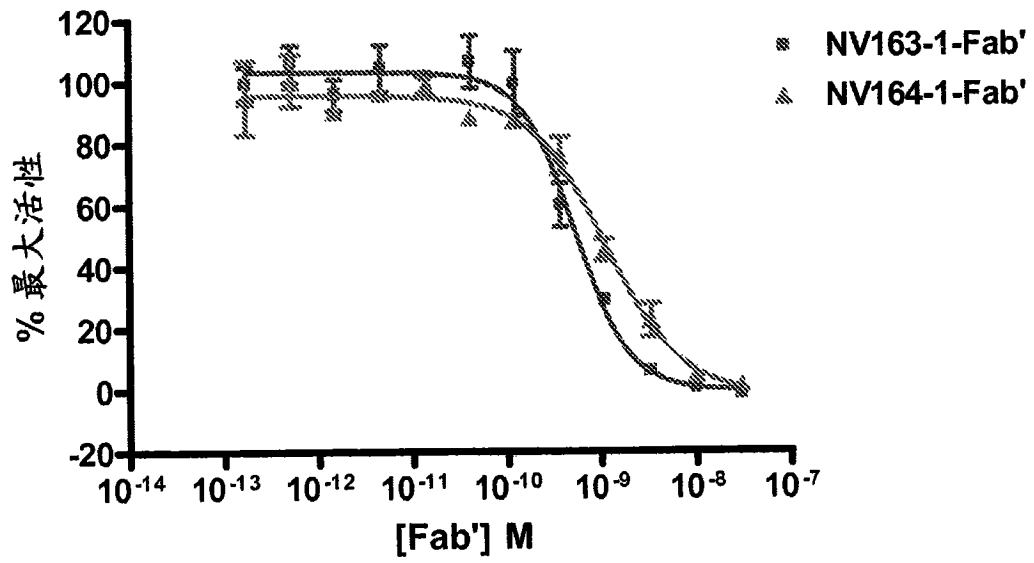


图 3

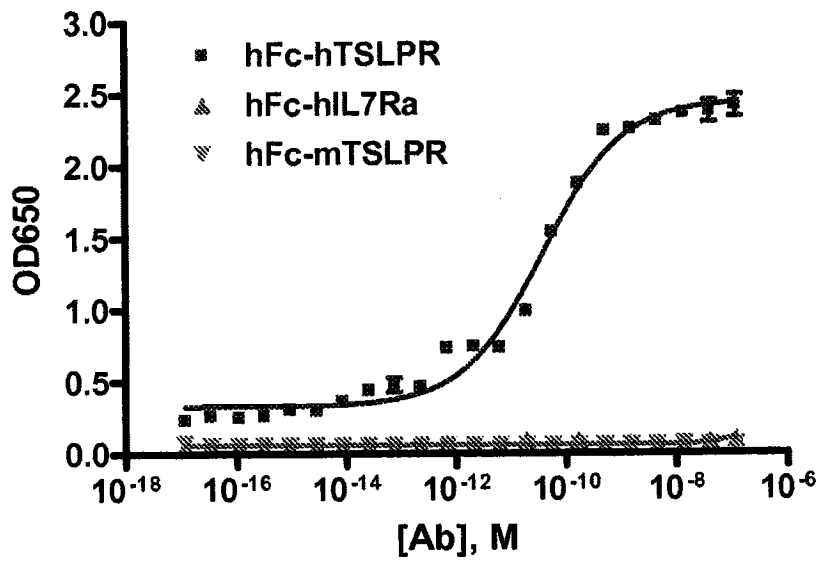


图 4

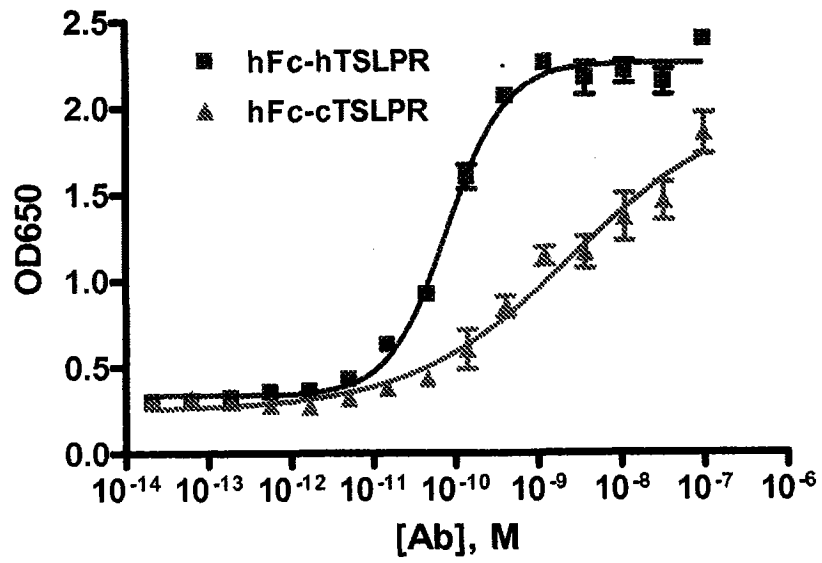


图 5

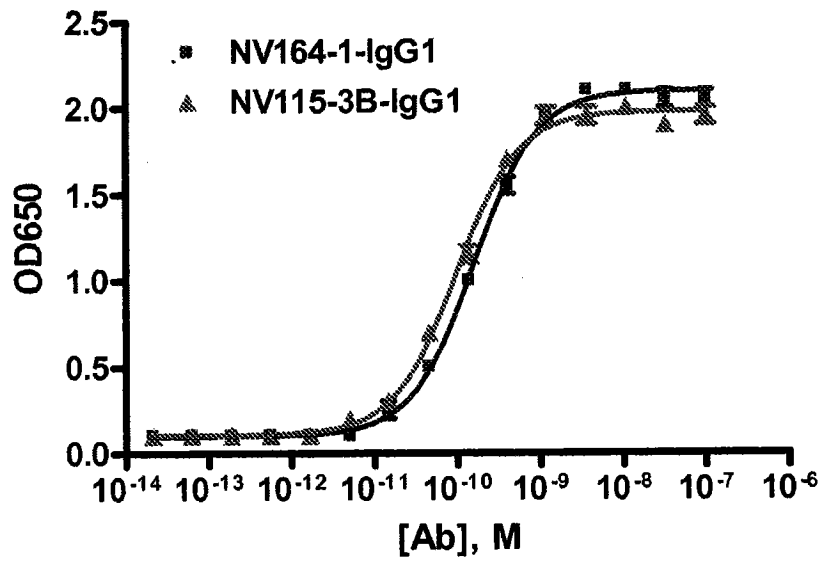


图 6

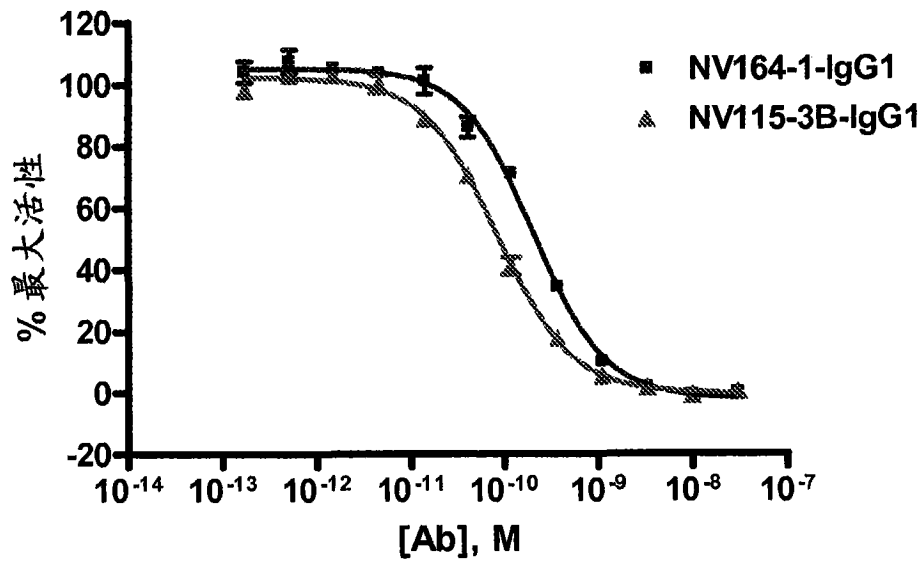


图 7

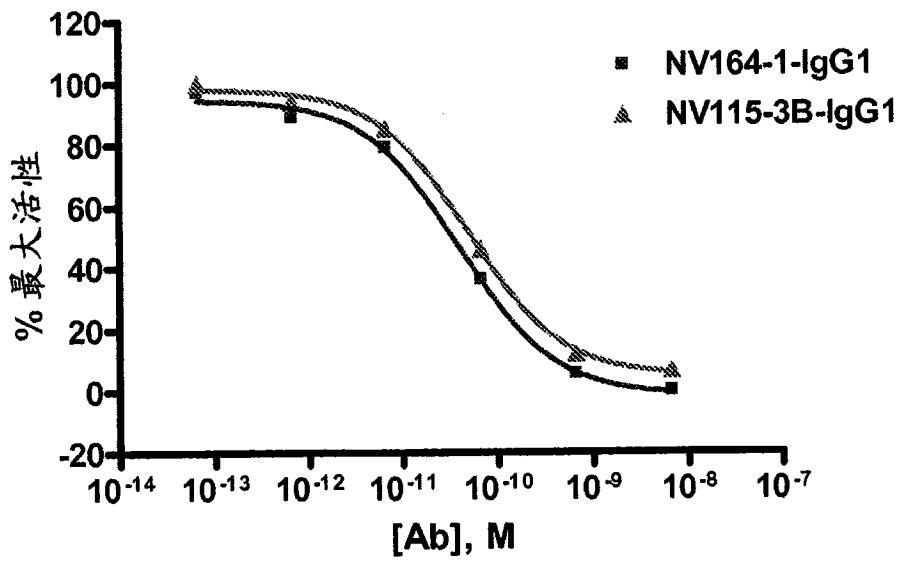


图 8

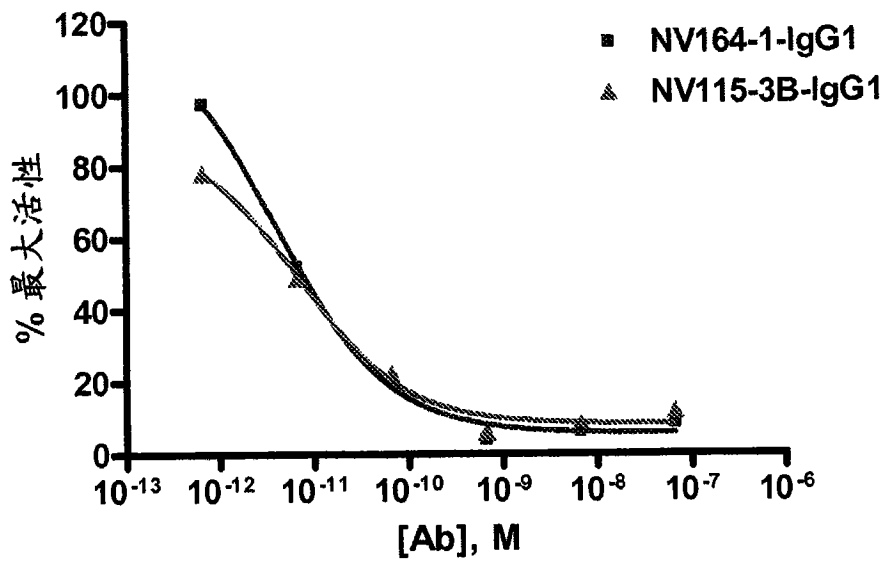


图 9

A. NV164-1-IgG1, 5 mg/kg

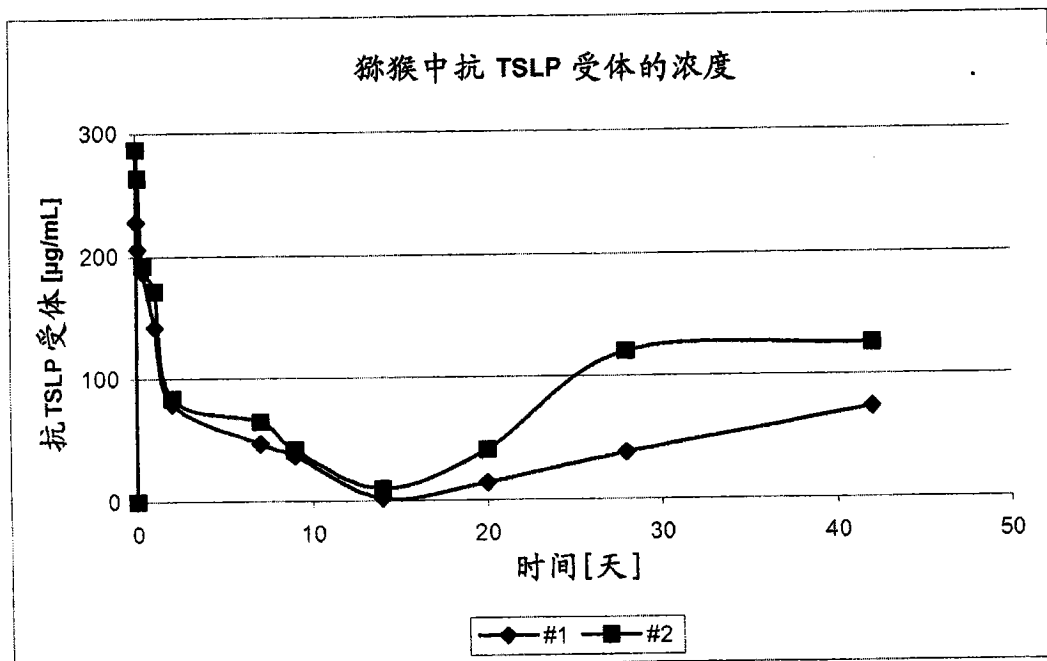


图 10

B. NV164-1-IgG1, 30 mg/kg

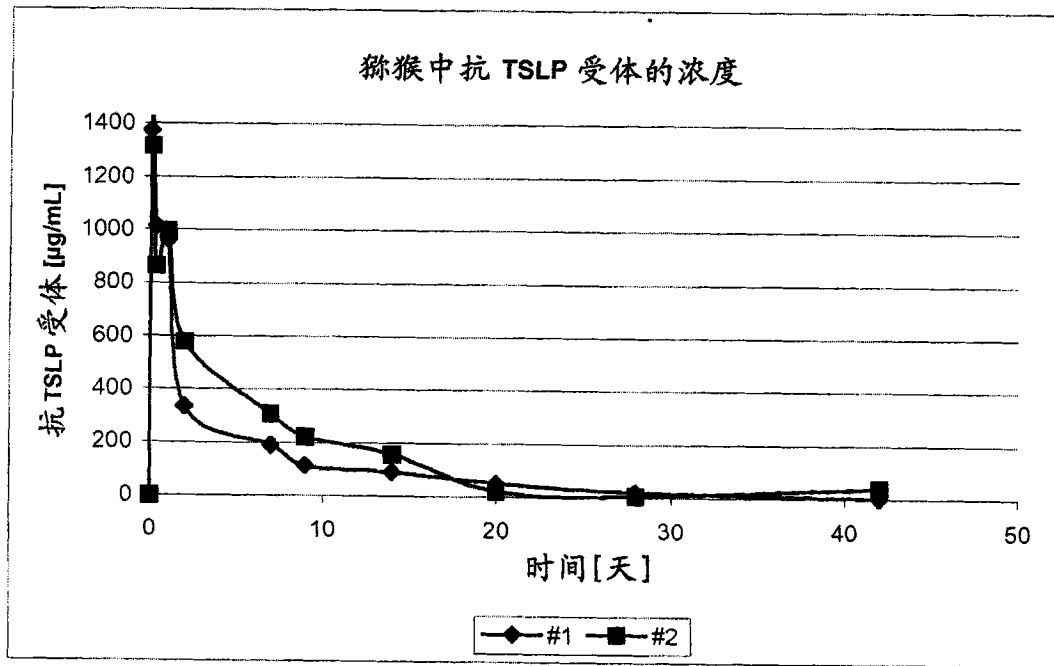


图 11