



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I746458 B

(45) 公告日：中華民國 110 (2021) 年 11 月 21 日

(21) 申請案號：105129100 (22) 申請日：中華民國 105 (2016) 年 09 月 08 日

(51) Int. Cl. : **G01N33/531 (2006.01)** **C07K14/00 (2006.01)**

(30) 優先權：2015/09/09 美國 62/216,050  
2016/05/27 美國 62/342,511

(71) 申請人：瑞士商諾華公司 (瑞士) NOVARTIS AG (CH)  
瑞士

(72) 發明人：愛德華茲 馬修 約翰 EDWARDS, MATTHEW JOHN (GB)；羅狄恩 珍-米歇  
瑞恩 RONDEAU, JEAN-MICHEL RENE (FR)；米勒 丹 MILLER, DAN (US)；  
黃定偉 HUANG, DANIEL (US)；克諾夫 漢斯-彼得 KNOPF, HANS-PETER  
(DE)；凡 西凱 季諾 安薩謬思 VAN HEEKE, GINO ANSELMUS (BE)；赫明  
雷內 HEMMIG, RENE (CH)；古樸塔 卡皮爾 GUPTA, KAPIL (US)；后伯斯特  
尼可 HAUBST, NICOLE (DE)；安德洛埃 芭芭拉 ANDLAUER, BARBARA (DE)

(74) 代理人：陳長文

(56) 參考文獻：

CN	102782149B	EP	1797902A2
WO	2007096149A1	WO	2007112146A2

審查人員：劉建宏

申請專利範圍項數：項 圖式數： 共頁

## (54) 名稱

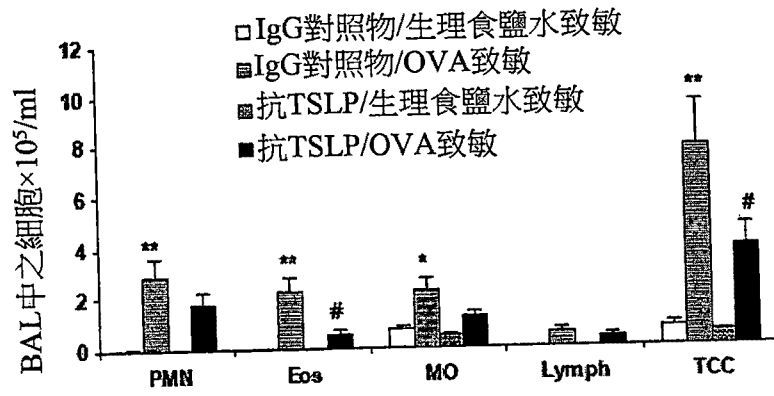
胸腺基質淋巴生成素(TSLP)-結合分子及該分子之使用方法

## (57) 摘要

本發明提供特異性結合胸腺基質淋巴生成素(TSLP)之分子(例如抗體或抗體片段)，包含此等分子之組合物，及使用及產生此等分子之方法。

The invention provides molecules, e.g., antibodies or antibody fragments, that specifically bind thymic stromal lymphopoietin (TSLP), compositions comprising these molecules, and methods of using and producing these molecules.

指定代表圖：



【圖3】

I746458

**【發明摘要】**

**【中文發明名稱】**

胸腺基質淋巴生成素(TSLP)-結合分子及該分子之使用方法

**【英文發明名稱】**

THYMIC STROMAL LYMPHOPOIETIN (TSLP)-BINDING MOLECULES  
AND METHODS OF USING THE MOLECULES

**【中文】**

本發明提供特異性結合胸腺基質淋巴生成素(TSLP)之分子(例如抗體或抗體片段)，包含此等分子之組合物，及使用及產生此等分子之方法。

**【英文】**

The invention provides molecules, e.g., antibodies or antibody fragments, that specifically bind thymic stromal lymphopoietin (TSLP), compositions comprising these molecules, and methods of using and producing these molecules.

**【指定代表圖】**

圖3

**【代表圖之符號簡單說明】**

無

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

胸腺基質淋巴生成素(TSLP)-結合分子及該分子之使用方法

### 【英文發明名稱】

THYMIC STROMAL LYMPHOPOIETIN (TSLP)-BINDING MOLECULES  
AND METHODS OF USING THE MOLECULES

### 【技術領域】

本發明提供特異性結合胸腺基質淋巴生成素(TSLP)之分子(例如抗體或抗體片段)，包含此等分子之組合物及使用且產生此等分子之方法。

### 【先前技術】

胸腺基質淋巴生成素(TSLP)為經由雜二聚體受體信號傳導之細胞激素，該雜二聚體受體由IL-7R $\alpha$ 次單位及與常見 $\gamma$ 受體樣鏈具有同源性之獨特組分TSLP-R組成(Pandey等人, Nat. Immunol. 2000, 1(1):59-64)。TSLP由胸腺、肺、皮膚、腸道及扁桃體中之上皮細胞以及氣管平滑肌細胞、肺纖維母細胞及基質細胞表現(Edwards, 2008, Drug news & perspectives 21, 312-316；He及Geha, 2010, Annals of the New York Academy of Sciences 1183, 13-24；Reche等人, 2001, Journal of immunology 167, 336-343)。此等細胞響應於促炎性刺激產生TSLP，且TSLP經由其對於多種先天性免疫細胞之活性而驅動過敏性發炎反應，該等先天性免疫細胞包括樹突狀細胞(Soumelis等人, 2002, Nature immunology 3, 673-680)、單核球(Reche等人, 2001, Journal of immunology 167, 336-343)及肥大細胞(Allakhverdi等人, 2007, The Journal of Experimental Medicine 204, 253-258)。已知TSLP-R及IL-7R $\alpha$ 均最高表現之細胞群體為骨髓樹突狀細胞(Reche等人,

2001, *Journal of immunology* 167, 336-343)。

TSLP可促進初始T細胞增殖且驅使其分化成表現高含量IL-4、IL-5及IL-13之Th2細胞(Omori及Ziegler, 2007, *Journal of immunology* 178, 1396-1404)。已在哮喘肺上皮細胞及慢性異位性皮膚炎病灶中發現高TSLP表現量，表明TSLP在過敏性炎症中之作用(Ziegler及Artis, 2010, *Nature immunology* 11, 289-293)。最新證據表明TSLP參與Th17細胞分化及Th17驅動之發炎性過程(Hartgring等人, 2011, *Arthritis and rheumatism* 63, 1878-1887；Tanaka等人, 2009, *Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 39, 89-100；Wu等人, 2014, *Journal of molecular and cellular cardiology* 76, 33-45)。慢性過敏性(異位性)哮喘常常藉由Th2型炎症表徵，而非過敏性哮喘炎症主要呈嗜中性，具有混合Th1及Th17細胞激素環境。哮喘中慢性炎症的後果包括支氣管高反應性(BHR)、黏液過度產生、氣管壁重塑及氣管變窄(Lambrecht及Hammad, 2014, *Nature immunology* 16, 45-56)。TSLP展示為參與過敏性哮喘反應之起始及維持/增強(Wang等人, 2006, *Immunity* 24, 827-838)。最近，亦發現TSLP信號傳導為記憶T細胞對局部抗原攻擊之回憶反應所需的(Wang等人, 2015, *The Journal of allergy and clinical immunology* 135, 781-791 e783)。

#### 【發明內容】

在一個態樣中，本文提供特異性結合人類胸腺基質淋巴生成素(TSLP)之分子，例如單株抗體或其抗體片段，諸如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、微型抗體或雙功能抗體。在一些實施例中，TSLP結合分子可包含：含有胺基酸序列SEQ ID NO: 4之重鏈互補決定區1 (HCDR1)；含有胺基酸序列SEQ

ID NO: 2之重鏈互補決定區2 (HCDR2)；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 3之重鏈互補決定區3 (HCDR3)；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 11之輕鏈互補決定區1 (LCDR1)；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 12之輕鏈互補決定區2 (LCDR2)；及含有胺基酸序列SEQ ID NO: 13之輕鏈互補決定區3 (LCDR3)。在一些實施例中，TSLP結合分子可包含：包含以下之分子：含有胺基酸序列SEQ ID NO: 5之HCDR1；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 6之HCDR2；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 3之HCDR3；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 14之LCDR1；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 15之LCDR2；及含有胺基酸序列SEQ ID NO: 16之LCDR3。

在一些特定實施例中，該分子包含結合人類TSLP且包含含有胺基酸序列SEQ ID NO: 4之HCDR1；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 2之HCDR2；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 3之HCDR3；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 11之LCDR1；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 12之LCDR2；及含有胺基酸序列SEQ ID NO: 13之LCDR3的抗體片段。在其他特定實施例中，該分子包含結合人類TSLP且包含含有胺基酸序列SEQ ID NO: 5之HCDR1；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 6之HCDR2；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 3之HCDR3；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 14之LCDR1；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 15之LCDR2；及含有胺基酸序列SEQ ID NO: 16之LCDR3的抗體片段。

在一些實施例中，TSLP結合分子可包含：含有胺基酸序列SEQ ID NO: 7之重鏈可變區及含有胺基酸序列SEQ ID NO: 17之輕鏈可變區。

在一些實施例中，TSLP結合分子可包含：含有胺基酸序列SEQ ID NO: 22之重鏈及含有胺基酸序列SEQ ID NO: 25之輕鏈。在一些實施例中，TSLP

結合分子可包含：含有胺基酸序列SEQ ID NO: 9之重鏈及含有胺基酸序列SEQ ID NO: 19之輕鏈。

在一些實施例中，TSLP結合分子可包含具有至少一個、至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個、至少六個、至少七個、至少八個、至少九個、至少十個、至少十一個、至少十二個、至少十三個、至少十四個、至少十五個、至少十六個、至少十七個、至少十八個、至少十九個或所有以下殘基之互補位：重鏈序列SEQ ID NO: 22之Thr28、Asp31、Tyr32、Trp33、Asp56、Glu101、Ile102、Tyr103、Tyr104、Tyr105或輕鏈序列SEQ ID NO: 25之Gly28、Ser29、Lys30、Tyr31、Tyr48、Asp50、Asn51、Glu52、Asn65及Trp92。

在一些實施例中，本文提供特異性結合人類TSLP之抗原決定基的分子，其中該抗原決定基包含至少一個、至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個、至少六個、至少七個、至少八個、至少九個、至少十個、至少十一個、至少十二個、至少十三個、至少十四個、至少十五個或所有以下殘基：SEQ ID NO: 38之Lys38、Ala41、Leu44、Ser45、Thr46、Ser48、Lys49、Ile52、Thr53、Ser56、Gly57、Thr58、Lys59、Lys101、Gln145及Arg149。在一些實施例中，此類分子結合包含SEQ ID NO: 38之以下各組殘基中之至少一者的抗原決定基：(a) Lys49及Ile52、(b) Gly57及Lys59、(c) Lys101或(d) Gln145及Arg149。

在一些實施例中，TSLP結合分子為特異性結合人類TSLP之人類免疫球蛋白。在一些實施例中，TSLP結合分子為單株抗體或選自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、微型抗體或雙功能抗體之抗體片段。在一些實施例中，TSLP結合分子為特異性結合人類TSLP之Fab，例如人類或人類化Fab。

在一些實施例中，本文所述之分子以小於100 pM之解離常數(K<sub>D</sub>)結合

人類TSLP。在一些實施例中，本文所述之分子以小於10 pM之解離常數( $K_D$ )結合人類TSLP。

在另一態樣中，本文提供包含至少一種本文所述之TSLP結合分子及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑的醫藥組合物。在一些實施例中，賦形劑:TSLP結合分子質量比大於0.5。在一些實施例中，TSLP結合分子為醫藥組合物之約5%至約95%、或約10%至約90%、或約15%至約85%、或約20%至約80%、或約25%至約75%、或約30%至約70%、或約40%至約60%、或約40-50% (w/w)。在一些實施例中，醫藥組合物包含殼形成劑，諸如三白胺酸或白胺酸。在一些實施例中，三白胺酸或白胺酸為組合物之約10-75% (w/w)。在一些實施例中，三白胺酸為組合物之約10-30% (w/w)。在其他實施例中，白胺酸為組合物之約50-75% (w/w)。在一些實施例中，醫藥組合物包含至少一種玻璃形成賦形劑，其中該玻璃形成賦形劑選自組胺酸、海藻糖、甘露醇、蔗糖或檸檬酸鈉。在一些實施例中，至少一種玻璃形成賦形劑為海藻糖或海藻糖與甘露醇之混合物。在一些實施例中，玻璃形成賦形劑為組合物之約15-35% (w/w)。在一些實施例中，醫藥組合物包含緩衝劑，諸如組胺酸、甘胺酸、乙酸鹽或磷酸鹽緩衝劑。在一些實施例中，緩衝劑為組合物之約5-13%。

在一些實施例中，本文所提供之醫藥組合物調配為乾燥粉末調配物，例如適於吸入之乾燥粉末調配物。

在一些實施例中，本文所提供之醫藥組合物包含具有殼及核心之噴霧乾燥粒子，其中該殼包含三白胺酸或白胺酸，且該核心包含：(i) TSLP結合分子、海藻糖、甘露醇及緩衝劑；或(ii) TSLP結合分子、海藻糖、緩衝劑及HCl。緩衝劑可為組胺酸、甘胺酸、乙酸鹽或磷酸鹽緩衝劑。



在一些實施例中，本文所提供之醫藥組合物包含噴霧乾燥粒子，該等噴霧乾燥粒子包含：(i)包含三白胺酸或白胺酸之殼；及(ii)包含海藻糖、甘露醇、組胺酸及TSLP結合分子之核心，或包含海藻糖、組胺酸、HCl及TSLP結合分子之核心，其中該TSLP結合分子為抗體Fab片段，該片段包含：(a)含有胺基酸序列SEQ ID NO: 4之HCDR1；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 2之HCDR2；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 3之HCDR3；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 11之LCDR1；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 12之LCDR2；及含有胺基酸序列SEQ ID NO: 13之LCDR3；或(b)含有胺基酸序列SEQ ID NO: 5之HCDR1；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 6之HCDR2；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 3之HCDR3；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 14之LCDR1；含有胺基酸序列SEQ ID NO: 15之LCDR2；及含有胺基酸序列SEQ ID NO: 16之LCDR3。

在一些實施例中，本文所提供之醫藥組合物包含：

- (a) 40% (w/w) TSLP結合分子、25% (w/w)三白胺酸、30% (w/w)組合重量之海藻糖與甘露醇及5% (w/w)組胺酸；
- b) 50% (w/w) TSLP結合分子、15% (w/w)三白胺酸、2.6% (w/w) HCl、5.6% (w/w)組胺酸及26.8% (w/w)組合重量之海藻糖與鹼；或
- c) 50% (w/w) TSLP結合分子、15% (w/w)三白胺酸、19.4% (w/w)海藻糖、13.04% (w/w)組胺酸及2.56% (w/w) HCl。

本文亦提供編碼任何本文所述之TSLP結合分子之核酸、包含此類核酸之載體及包含該核酸或該載體之宿主細胞。

亦提供產生本文所述之TSLP結合分子的方法。此類方法可包括(a)培養表現編碼該分子之核酸的宿主細胞；及(b)自培養基收集該分子。

在另一態樣中，本文提供包含至少一種本文所述之TSLP結合分子或醫藥組合物及用於向個體遞送該分子或醫藥組合物之裝置的套組。在一些實施例中，裝置可遞送呈氣溶膠化形式之分子或醫藥組合物。在一些實施例中，裝置為乾燥粉末吸入器。

在另一態樣中，本文提供治療有需要之個體(例如人類患者)之TSLP相關病狀的方法，其藉由向該個體投與治療有效量之任何本文所述之TSLP結合分子或醫藥組合物。亦提供如本文所述用於治療有需要之個體之TSLP相關病狀的分子或醫藥組合物。亦包括本文所述之TSLP結合分子或醫藥組合物治療有需要之個體之TSLP相關病狀的用途。本發明亦包括本文所述之分子在製造用於治療有需要之個體之TSLP相關病狀之藥物中的用途。

TSLP相關發炎性病狀可為哮喘、慢性阻塞性肺病、過敏性鼻炎、過敏性鼻竇炎、過敏性結膜炎、嗜伊紅血球性食道炎或異位性皮膚炎中之任一者。在一些實施例中，TSLP相關發炎性病狀為哮喘。在一些實施例中，TSLP結合分子調配為適於吸入之乾燥粉末調配物。在一些實施例中，TSLP結合分子例如以氣溶膠化形式經口或鼻內投與個體。在一些實施例中，TSLP結合分子藉由乾燥粉末吸入器投與個體。

在一些實施例中，治療TSLP相關病狀之方法或TSLP結合分子之用途另外包括向需要治療之個體投與第二藥劑。第二藥劑可為皮質類固醇、支氣管擴張劑、抗組胺劑、抗白三烯劑或PDE-4抑制劑。

在另一態樣中，本文提供用於製造包含本文所述之TSLP結合分子之乾燥粉末調配物的方法。此類方法可包括以下步驟中之一或多者：(a)提供包含如本文所述之TSLP結合分子、三白胺酸或白胺酸、玻璃形成賦形劑及緩衝劑之水溶液；(b)在約120°C至約200°C(入口)範圍及55°C至約75°C(出

口)之溫度下噴霧乾燥步驟(a)之水溶液以產生乾燥粉末粒子；及(c)收集該等乾燥粉末粒子。在一些實施例中，緩衝劑係選自組胺酸、甘胺酸、乙酸鹽或磷酸鹽緩衝劑。在一些實施例中，玻璃形成賦形劑係選自組胺酸、組胺酸HCl、海藻糖、甘露醇、蔗糖或檸檬酸鈉。

本發明之一或多個實施例的詳情闡述於附圖及以下實施方式中。本發明之其他特徵、目標及優勢將自實施方式及圖式以及自申請專利範圍顯而易知。

### 【圖式簡單說明】

圖1A展示抗人類TSLP Fab1重鏈之胺基酸序列(SEQ ID NO: 22)，其中CDR加下劃線(如藉由Kabat所定義)且位於抗體-抗原介面之殘基經\*標記。圖1B展示抗人類TSLP Fab1輕鏈之胺基酸序列(SEQ ID NO: 25)，其中CDR加下劃線(如藉由Kabat所定義)且位於抗體-抗原介面之殘基經\*標記。

圖2展示用於結晶學研究之重組人類TSLP的胺基酸序列(SEQ ID NO: 38)，其中二級結構要素展示在胺基酸序列下方。方塊表示 $\alpha$ -螺旋 $\alpha_A$ 、 $\alpha_B$ 、 $\alpha_C$ 及 $\alpha_D$ ，且粗線表示環區。成熟人類TSLP始於Tyr29。此處所用之構築體具有N端六組胺酸標籤(SEQ ID NO: 40) (殘基15-20)，接著為HRV-3C蛋白酶(PreScission)識別位點(殘基21-28)及由選殖產生之殘基11-14。Asn64及Asn119為潛在的N-連接糖基化位點；且殘基127-130構成弗林蛋白酶裂解位點。

圖3為展示TSLP中和對於用抗原攻擊之卵白蛋白致敏小鼠之肺炎症的作用的條形圖。用卵白蛋白(OVA)或生理食鹽水加饜致敏之小鼠在致敏之前1小時接受抗鼠類TSLP或同型對照抗體之靜脈內投與。所有小鼠在第

21天經OVA攻擊且在24小時處死。值表示總體平均值  $\pm$  SEM (標準誤平均值)且計數BAL內之分化細胞。使用未配對學生T檢驗進行統計學分析。經同型處理之生理食鹽水致敏及OVA致敏小鼠之間的顯著差異在 $p < 0.05$ 下由(\*)標示且在 $p < 0.01$ 下由(\*\*)標示。經同型及抗TSLP抗體處理之OVA致敏小鼠之間的差異在 $p < 0.05$ 下由(#)標示。[PMN：多形核細胞(嗜中性白血球)；Eos：嗜伊紅血球；MO：單核球；Lymph：淋巴球；TCC：總細胞計數。]

圖4A-圖4C為一系列條形圖，其展示TSLP中和顯著減少卵白蛋白致敏、抗原攻擊之小鼠的肺內IL-13 (圖4A)、嗜酸性粒細胞趨化因子-2 (CCL24，圖4B)及胸腺及活化調節之趨化因子(TARC、CCL17，圖4C)的含量。用OVA(或生理食鹽水)加礬致敏之小鼠在致敏之前1小時接受抗鼠類TSLP或同型對照抗體之靜脈內投與。所有小鼠在第21天經OVA攻擊且在24小時處死。值表示藉由特異性ELISA量測之BAL中介體的平均值 $\pm$ SEM含量。使用未配對學生T檢驗進行統計學分析。經同型處理之生理食鹽水致敏及OVA致敏小鼠之間的顯著差異在 $p < 0.05$ 下由(\*)標示且在 $p < 0.01$ 下由(\*\*)標示。經同型及抗TSLP抗體處理之OVA致敏小鼠之間的差異在 $p < 0.05$ 下由(#)標示。

圖5為展示猴之總抗TSLP Fab1之平均血清濃度-時間分佈的線圖。

圖6A及圖6B為展示猴在最後一次吸入劑量後1小時(1、10、20毫克/公斤/天吸入組)或6天(1毫克/公斤IV+20毫克/公斤/天吸入組)之BAL (6A)或肺組織勻漿(6B)中總抗TSLP Fab1之平均濃度的條形圖。

圖7說明與抗TSLP Fab1複合之人類TSLP的綜覽。TSLP螺旋自N端至C端標記A至D。

圖8展示由抗TSLP Fab1靶向之TSLP抗原決定基。圖之上部展示在4.0 Å距離內非氫原子之間之直接分子間接觸的數目，且下部展示在複合物形成後溶劑可及表面減少。TSLP之胺基酸序列(SEQ ID NO: 41)顯示於橫軸上。

圖9展示TSLP抗原決定基之抗體視圖。TSLP以帶式草圖展示。涉及與Fab1直接接觸(4.0 Å距離截止)之所有胺基酸殘基以球-棍圖展示。

圖10A及圖10B展示抗TSLP Fab1之重鏈(SEQ ID NO: 42) (A)及輕鏈(SEQ ID NO: 43) (B)互補位。圖之上部展示非氫原子之間之直接分子間接觸( $\leq 4.0$  Å)的數目，且下部展示在複合物形成後溶劑可及表面減少。重鏈或輕鏈可變域之胺基酸序列顯示於橫軸上。

圖11A-圖11C展示抗TSLP Fab1之作用模式。圖11A為小鼠細胞外信號傳導複合物之視圖，其中IL-7R $\alpha$ 呈黑色且TSLPR呈淡灰色。圖11B為人類TSLP-Fab1複合物在與圖11A相同的定向中的視圖。圖11C為基於細胞激素C $\alpha$ 原子之兩種複合物的結構重疊圖。小鼠信號傳導複合物呈淡灰色，人類TSLP-Fab1複合物呈黑色。

圖12為說明在較高賦形劑:蛋白質比率下之調配物改良抗TSLP Fab1之物理化學穩定性的散佈圖，如由蛋白質聚集率減小所示。

## 【實施方式】

### 定義

如本說明書及申請專利範圍中所用，除非上下文另外明確指示，否則單數形式「一(a/an)」及「該」包括複數個參考物。舉例而言，術語「細胞」包括複數個細胞，包括其混合物。

所有數值標示(例如pH、溫度、時間、濃度及分子量，包括範圍)為以

增量0.1改變(+)或(-)之近似值。應瞭解，儘管未必總明確陳述，但所有數值標示前存在術語「約」。亦應瞭解，儘管未必總明確陳述，但本文所述之試劑僅為實例且其等效物為此項技術中已知的。

如本文所用，「TSLP」(亦稱為「胸腺基質淋巴生成素」)係指響應於促炎性刺激而由非造血細胞產生之細胞激素。人類TSLP基因定位於染色體位置5q22.1，且TSLP基因之基因組序列可見於GenBank NC\_000005.10。由於替代性拼接，兩種TSLP同功異型物存在於人類中。兩種人類TSLP同功異型物之蛋白質及mRNA序列在表1中列出。

**表1. TSLP胺基酸及mRNA序列**

物種	同功異型物	GeneBank寄 存 編號	序列
智人	TSLP同功異型物1胺基酸	NP_149024.1	MFPFALLYVLSVSFRKIFILQLVGLVLTLYDFTNC DFEKIKAAYLSTISKDLITYMSGTKSTEFNNTVS CSNRPHCLTEIQSLTFNPTAGCASLAKEMFAMK TKAALAIWCPGYSETQINATQAMKKRRKRKVT TNKCLEQVSQLQLWRRFNRPLLKQQ (SEQ ID NO: 27)
智人	TSLP同功異型物1 mRNA	NM_033035.4	GCAGCCAGAA AGCTCTGGAG CATCAGGGAG ACTCCAATT AAGGCAACAG CATGGGTGAA TAAGGGCTTC CTGTGGACTG GCAATGAGAG GCAAAACCTG GTGCTTGAGC ACTGGCCCCCT AAGGCAGGCC TTACAGATCT CTTACACTCG TGGTGGGAAG AGTTTAGTGT GAAACTGGGG TGGAATTGGG TGTCCACGTA TGTTCCCTTT TGCCTTACTA TATGTTCTGT CAGTTTCTTT CAGGAAAATC TTCATCTTAC AACTTGTAGG GCTGGTGTTA ACTTACGACT TCACTAACTG TGACTTTGAG AAGATTAAAG CAGCCTATCT CAGTACTATT TCTAAAGACC TGATTACATA TATGAGTGGG ACCAAAAGTA CCGAGTTCAA CAACACCGTC TCTTGTAGCA ATCGGCCACA TTGCCTTACT GAAATCCAGA GCCTAACCTT CAATCCCACC GCCGGCTGCG CGTCGCTCGC CAAAGAAATG TTCGCCATGA AACTAAGGC TGCTTAGCT ATCTGGTGCC CAGGCTATTC GGAAACTCAG ATAAATGCTA CTCAGGCAAT GAAGAAGAGG AGAAAAAGGA AAGTCACAAC CAATAAATGT CTGGAACAAG TGTCACAATT ACAAGGATTG TGGCGTCGCT TCAATCGACC TTACTGAAA CAACAGTAAA CCATCTTTAT TATGGTCATA TTTCACAGCA CAAAATAAA TCATCTTTAT TAAGTAGATG AAACATTAAC TCTAACTGTG ACAAAGAAGA CCACAAATAG

			TTATCTTTTA ATTACAGAAG AGTTTCTTAA CTTACTTTTG TAAGTTTTTA TTGTGTAAGT TTATAATGCA GGGGAAGTAC TACTCCTCAA ATGTTGAGGG AAGCTTCCAT AACATTGATG ACTGGCTTCA TGGCAGTAAT TCTCGGCTGT AGTTGCATAA GCATTGCTCA AGAGGAAAAT CCAAAAGTGC AGCAGGAGAA CTCTTTTCCC TGAAAAGGA AAAATATTGA ACTCAATGAT AGCACCTAAA CTTACATTTA AAAGACAGAC ATTCCTTCTA CATGTAATGA CACTTCTTGT GTTAAACTAA AAATTTACAA GAGAAGAAAG TGAAAGCAA TGGGGTTTCA CAAATAGTTG TAAATATAGT GAAGCAATTT GAAATAATTT TCAAGCAAAG TATTGTGAAA GTATTCTAAG CCAAGTTTTA AATATTATCT AACAGACAAG AGTGGTATAT ACAAGTAGAT CCTGAGAAGT ACCTTTGTTA CAGCTACTAT AAATATACAT ATAAATTATA GAATCTACTT TAATTTATTT TGTGAACACT TTTGAAAATG TACATGTTCC TTTGTAATTG AACTATATA TTTCTTAATA AAATAATTCT CAAATTTGTT TCTTATGAAT CATCTCTCAA ATCTAGTTAG ACAATTTGCA CACATACTTT TCTAAGGGAC ATTATCTTCC TTCAGGTTTT TACCTCCACT CATCCTTAGA GCCCACTGAC TGCTCCCCTT TATACCTGTT GGCCCTGCCT ATAGGAGAGA ATATTTGGAG ATAGGCAGCT TCAGGATGCA TTGCAATCAT CCTTTTCTTA AATTATGTCA CTAGTCITTT ATTTTTTCCC CTCTTGAAC TFCCTCACAC CTGGAAGAAA CAAAGTAGGA AAAAGTGAAC AGGGGATGTC AAATCGATTC TTGAATTTCC GCTGCAAGCT AGAGCCGCAG GCACCCTCTC ACTCAATTC CACTCAGAAC CCTATAAACA CCAGTGGGAA GGGCAACCCA CTGCACGTGG GAATGCACTG ATTTTTCTTA GGAGTAGACA TGTTCTCTA ATTACTCCCT GAGGGTTAGT TGGGGCTAAA CCATGACAGA AGTGGGGAAG TTCAATGTCC TTAAATCCAT CTTACTTGCC AACAGGTAAG AGGAAGCTTA CATTACATGT CCAGTCCACA TTAAAGAGC ACTTACTGTG GAACAAGCCT TCAGCCAAAC AATGGGGATA GAAAAGTAGG TAAGACTCAG CCTTTGTCCA GAGAAGCTCA GGGTATAGCT GAATAGGCAG TTTCTTTTGT CCTGAGGAAA ATCAGGACAT GCCTGCTTTC TAAAAATCTT CCTCTGAAGA CCTGACCCAA GCTCTTAAAT GCTATTGTAA GAGAAATTC TTTGTCTATT AACTCCATTT TAGTAGGGAT TCACTGACTA GATTTTACTG AACTATGAAA ATAAATACAC ATAATTTTTC ACAAAATTTT GGGCCCAATT CCCCTAAAAG AATTGAGGAT TAGGGAGAAA GGAGACAAC CAAAGTCATC CCATTAAGTG CAGTTTCTTT GAATCTTCTG CTTTATCTTT AAAAATTTGT ATAATTTATA TATTTTATTC TATGTGTTCC ATAGATATCT TAATGTAAAA TTAGTCATTT AAATTACACT GTCAATTAAGTAATGGGC
--	--	--	--

			AAGAGATTGC ATCATACTAA TTTAGTAAGA ACGTTCCCAA ATGTTGTAAC AATGTGGATC ATACATCTCT GGTTTTTTAA ATGTATTGAG GCTTTCTTGG TGGACTAGTA TAGTATACGG TCAGTTATGT CAATGTTTCA TGGTCAATAA AAAGGAAGTT GCAAATTGT (SEQ ID NO: 28)
智人	TSLP同功 異型物2胺 基酸	NP_612561.2	MFAMKTKAALAIWCPGYSETQINATQAMKKRR KRKVTTNKCLEQVSQLQGLWRRFNRPLLKQQ (SEQ ID NO: 29)
智人	TSLP同功 異型物2 mRNA	NM_138551.4	ACCCTCGCCA CGCCCTGCT CCCCCGCGGT TGGTTCTTCC TTGCTCTACT CAACCCTGAC CTCTTCTCTC TGACTCTCGA CTTGTGTTCC CCGCTCCTCC CTGACCTTCC TCCCCTCCCC TTTCACTCAA TTCTACCAA CTCTTTCTCT CTCTGGTGT TTCTCCTTTT CTCGTAAACT TTGCCGCCTA TGAGCAGCCA CATTGCCTTA CTGAAATCCA GAGCCTAACC TTCAATCCCA CCGCCGGCTG CGCGTCGCTC GCCAAAGAAA TGTTCCGCAT GAAACTAAG GCTGCCTTAG CTATCTGGTG CCCAGGCTAT TCGGAAACTC AGATAAATGC TACTCAGGCA ATGAAGAAGA GGAGAAAAAG GAAAGTCACA ACCAATAAAT GTCTGGAACA AGTGTCAACA TTACAAGGAT TGTGGCGTCG CTTCAATCGA CCTTTACTGA AACACAGTA AACCATCTTT ATTATGGTCA TATTTACAG CACCAAATA AATCATCTTT ATTAAGTAGA TGAAACATTA ACTCTAACTG TGACAAAGAA GACCACAAAT AGTTATCTTT TAATTACAGA AGAGTTTCTT AACTTACTTT TGTAAGTTTT TATTGTGTA GTTTATAATG CAGGGGAAGT ACTACTCCTC AAATGTTGAG GGAAGCTTCC ATAACATTGA TGACTGGCTT CATGGCAGTA ATTCTCGGCT GTAGTTGCAT AAGCATTGCT CAAGAGGAAA ATCCAAAAGT GCAGCAGGAG AACTCTTTT CCTGAAAAG GAAAATATT GAACTCAATG ATAGCACCTA AACTTACATT TAAAAGACAG ACATTCTTCT TACATGTAAT GACACTTCTT GTGTTAAACT AAAAATTTAC AAGAGAAGAA AGTGAAAGCA AATGGGGTTT CACAAATAGT TGTAATATA GTGAAGCAAT TTGAAATAAT TTTCAAGCAA AGTATTGTGA AAGTATTCTA AGCCAAGTTT TAAATATTAT CTAACAGACA AGAGTGGTAT ATACAAGTAG ATCCTGAGAA GTACCTTTGT TACAGCTACT ATAAATATAC ATATAAATTA TAGAATCTAC TTTAATTTAT TTTGTGAACA CTTTTGAAAA TGTACATGTT CCTTTGTAAT TGACACTATA TATTTCTTAA TAAAATAATT CTCAAATTTG TTTCTTATGA ATCATCTCTC AAATCTAGTT AGACAATTTG CACACATACT TTTCTAAGGG ACATTATCTT CCTTCAGGTT TTTACCTCCA CTCATCCTTA GAGCCCCTG ACTGCTCCCC TTTATACCTG TTGGCCCTGC CTATAGGAGA GAATATTTGG AGATAGGCAG CTTCAGGATG CATTGCAATC ATCCTTTTCT



			TAAATTATGT CACTAGTCTT TTATTTTTTC CCCTCTTGAA CTTTCCTCAC ACCTGGAAGA AACAAAGTAG GAAAAAGTGA ACAGGGGATG TCAAATCGAT TCTTGAATTC CCGCTGCAAG CTAGAGCCGC AGGCACCCTC TCACTCAATT TCCACTCAGA ACCCTATAAA CACCAGTGGG AAGGGCAACC CACTGCACGT GGAATGCAC TGATTTTTCC TAGGAGTAGA CATGTTCCCTC TAATTACTCC CTGAGGGTTA GTTGGGGCTA AACCATGACA GAAGTGGGGA AGTTCAATGT CCTTAAATCC ATCTTACTTG CCAACAGGTA AGAGGAAGCT TACATTACAT GTCCAGTCCA CATTTAAAGA GCACTTACTG TGGAACAAGC CTTCAGCCAA ACAATGGGGA TAGAAAAGTA GGTAAGACTC AGCCTTTGTC CAGAGAAGCT CAGGGTATAG CTGAATAGGC AGTTTCTTTT GTCCTGAGGA AAATCAGGAC ATGCCTGCTT TCTAAAAATC TTCCTCTGAA GACCTGACCC AAGCTCTTAA ATGCTATTGT AAGAGAAATT TCTTTGTCTA TTA ACTCCAT TTTAGTAGGG ATCACTGAC TAGATTTTAC TGA ACTATGA AAATAAATAC ACATAATTTT TCACAAAATT TTGGGCCCAA TTCCCCTAAA AGAATTGAGG ATTAGGGAGA AAGGAGACAA CTCAAAGTCA TCCCATTAAG TGCAGTTTCT TTGAATCTTC TGCTTTATCT TTAAAAATTT GTATAATTTA TATATTTTAT TCTATGTGTT CCATAGATAT CTTAATGTAA AATTAGTCAT TTAAATTACA CTGTCAATTA AAAGTAATGG GCAAGAGATT GCATCATACT AATTTAGTAA GAACGTTCCC AAATGTTGTA ACAATGTGGA TCATACATCT CTGGTTTTTT AAATGTATTG AGGCTTTCTT GGTGGACTAG TATAGTATAC GGTCAGTTAT GTCAATGTTT CATGGTCAAT AAAAAGGAAG TTGCAAATTG T (SEQ ID NO: 30)
食蟹獼猴	TSLP胺基酸		YDFTNCDFEKIEADYLRTISKDLITYMSGTKSTD FNNTVSCSNRPHCLTEIQSLTFNPTPRCASLAKE MFARKTKATLALWCPGYSETQINATQAMKKRR KRKVTTNKCLEQVSQLLGLWRRFIRTLKKQ (SEQ ID NO: 31)
食蟹獼猴	TSLP mRNA		TACGACTTCACCAACTGCGACTTCGAGAAGAT CGAGGCCGACTACCTGAGAACCATCAGCAAG GACCTGATCACCTACATGAGCGGCACCAAGA GCACCGACTTCAACAACACCGTGTCTGCAGC AACAGACCCCACTGCCTGACCGAGATCCAGA GCCTGACCTTCAACCCCAACCCAGATGTGCC AGCCTGGCCAAAGAGATGTTCCGAGAAAGA CCAAGGCCACCCTGGCCCTGTGGTGTCCCGGC TACAGCGAGACACAGATCAACGCCACACAGG CCATGAAGAAGCGGCGGAAGCGGAAAGTGAC CACCAACAAGTGCCTGGAACAGGTGTACAG CTGCTGGGGCTGTGGCGGCGGTTTCATCCGGAC CCTGCTGAAGAAGCAG (SEQ ID NO: 32)
小家鼠	TSLP同功異型物1胺	NP_067342.1	MVLLRSLFILQVLVRMGLTYNFSNCNFTSITKIY CNIIFHDLTGDLKGAKFEQIEDCESKPACLKIEY YTLNPIPGCPSLPDKTFARRTREALNDHCPGYPE

	基酸		TERNDGTQEMAQEVQNICLNQTSQILRLWYSF MQSPE (SEQ ID NO: 33)
小家鼠	TSLP同功 異型物1 mRNA	NM_021367.2	CACGTTTCAGG CGACAGCATG GTTCTTCTCA GGAGCCTCTT CATCCTGCAA GTACTAGTAC GGATGGGGCT AACTTACAAC TTTTCTAACT GCAACTTCAC GTCAATTACG AAAATATATT GTAACATAAT TTTTCATGAC CTGACTGGAG ATTTGAAAGG GGCTAAGTTC GAGCAAATCG AGGACTGTGA GAGCAAGCCA GCTTGTCTCC TGAAAATCGA GTACTATACT CTCAATCCTA TCCCTGGCTG CCCTTCACTC CCCGACAAAA CATTTGCCCG GAGAACAAGA GAAGCCCTCA ATGACCACTG CCCAGGCTAC CCTGAAACTG AGAGAAATGA CGGTACTCAG GAAATGGCAC AAGAAGTCCA AAACATCTGC CTGAATCAAA CCTCACAAAT TCTAAGATTG TGGTATTCTT TCATGCAATC TCCAGAATAA AATTAGCTTT CAGCTTCTGC TATGAAAATC TCTATCTTGG TTTTAGTGGA CAGAATACTA AGGGTGTGAC ACTTAGAGGA CCACTGGTGT TTATTCTTTA ATTACAGAAG GGATTCTTAA CTTATTTTTT GGCATATCGC TTTTTTCAGT ATAGGTGCTT TAAATGGGAA ATGAGCAATA GACCGTTAAT GGAAATATCT GTACTGTAA TGACCAGCTT CTGAGAAGTC TTTCTCACCT CCCCTGCACA CACCTTACTC TAGGGCAAAC CTAAGTGTAG TAGGAAGAGA ATTGAAAGTA GAAAAAAAAA ATTAACCA ATGACAGCAT CTAACCCTG TTTAAAAGGC AAGGATTTTT CTACCTGTAA TGATTCTTCT AACATTCTA TGCTAAGATT TTACCAAAGA AGAAAATGAC AGTTCGGGCA GTCAGTCCA TGATGAGGTG GTCTGAAAGA AGATTGTGGA ATCTGGGAGA AACTGCTGAG ATCATATTGC AAATCCAGCT GTCAAAGGGT TCAGACCCAG GACAGTACAA TTCGTGAGCA GATCTCAAGA GCCTTGCACA TCTACGAGAT ATATATTTAA AGTTGTAGAT AATGAATTTT TAATTTATTT TGTGAGCACT TTTGGAAATA TACATGCTAC TTTGTAATGA ATACATTCT GAATAAAGTA ATTCTCAAGT TTGAAAAAAAA AAA (SEQ ID NO: 34)
小家鼠	TSLP同功 異型物2 mRNA	NR_033206.1	ACTCTTGCCA GGCACCTCCC TCCTGTGGGT TGATTCCGTT TTCCTCTTCT CAACTGACTC TGGATTCTGA TACCAGACAC CTTCCTGGTG TCTTTCCCTC CTATCCCCAT CCCCTTCCCT GTCCCTTTCA TTCAATTTTT AATATCTGGC GGGTTTTTTT TTTTTTTTCT CTCTCTCTGA ACTGTGCCGC TTGTGAGCAG CCAGCTTGTC TCCTGAAAAT CGAGTACTAT ACTCTCAATC CTATCCCTGG CTGCCCTTCA CTCCCCGACA AAACATTTGC CCGGAGAACA AGAGAAGCCC TCAATGACCA CTGCCAGGC TACCCTGAAA CTGAGAGAAA TGACGGTACT CAGGAAATGG CACAAGAAGT CCAAACATC TGCCTGAATC AAACCTCACA AATTCTAAGA TTGTGGTATT CCTTCATGCA ATCTCCAGAA TAAAATTAGC

			<p>TTTCAGCTTC TGCTATGAAA ATCTCTATCT  TGGTTTTAGT GGACAGAATA CTAAGGGTGT  GACTTTAGA GGACCACTGG TGTTTATTCT  TTAATTACAG AAGGGATTCT TAACTATTT  TTTGGCATAT CGCTTTTTTC AGTATAGGTG  CTTTAAATGG GAAATGAGCA ATAGACCGTT  AATGGAAATA TCTGTACTGT TAATGACCAG  CTTCTGAGAA GTCTTTCTCA CCTCCCCTGC  ACACACCTTA CTCTAGGGCA AACCTAACTG  TAGTAGGAAG AGAATTGAAA GTAGAAAAAA  AAAATTAATA CCAATGACAG CATCTAAACC  CTGTTTAAAA GGCAAGGATT TTTCTACCTG  TAATGATTCT TCTAACATTC CTATGCTAAG  ATTTTACCAA AGAAGAAAAT GACAGTTCGG  GCAGTCACTG CCATGATGAG GTGGTCTGAA  AGAAGATTGT GGAATCTGGG AGAAACTGCT  GAGATCATAT TGCAAATCCA GCTGTCAAAG  GGTTCAGACC CAGGACAGTA CAATTCGTGA  GCAGATCTCA AGAGCCTTGC ACATCTACGA  GATATATATT TAAAGTTGTA GATAATGAAT  TTCTAATTTA TTTTGTGAGC ACTTTTGAA  ATATACATGC TACTTTGTAA TGAATACATT  TCTGAATAAA GTAATTCTCA AGTTTGAAAA  AAAAAA (SEQ ID NO: 35)</p>
褐家鼠	TSLP胺基 酸	XP_008770274.1	<p>MVLFYRLFILQVVRLALTYNFSNCFEMILRIYH  ATIFRDLLKDLNGILFDQIEDCDSRTACLLKIDH  HTFNPVPGPSLPEKAFALKTKAALINYPGY  SETERNGTLEMTREIRNICLNQTSQILGLWLSCIQ  S (SEQ ID NO: 36)</p>
褐家鼠	TSLP mRNA	XM_008772052.1	<p>TCAGGCAACA GCATGGTTCT TTTCAGGTAC  CTCTTTATCC TGCAAGTGGT ACGGCTGGCA  CTAACTTACA ACTTTTCTAA CTGTAACCTC  GAGATGATTT TGAGAATATA TCATGCAACA  ATTTTTCGTG ACCTGCTTAA AGATTTGAAT  GGGATCTTGT TCGACCAAAT CGAGGACTGT  GACAGCAGGA CAGCTTGTCT CCTGAAAATC  GACCACCATA CCTTCAATCC TGTCCCTGGC  TGCCCGTCAC TCCCGAGAA AGCGTTCGCT  TTGAAAACGA AAGCGGCCCT CATTAACTAC  TGCCCAGGCT ACTCTGAAAC TGAGAGAAAT  GGTACTCTGG AAATGACACG AGAAATCAGA  AACATCTGCC TGAATCAAAC CTCACAAATT  CTAGGATTGT GGCTTTCCTG CATTCAATCT  TGAAGAAAAA ATTAGCTTTT GGATTATATT  ATGAAAATAT ATATCTTGTT TTAGTAGAT  ATAATACTAA GGGTGTGACA CTAAAAGAA  CACTAATGTT TATTCTTTAA TTATAGAAGG  GATTCTTAAC TTATTTTGG CATATCGTTG  TTAGTGTAG GCGCTTTAAA TGGAAAATGA  GCATTACCC TTTAATGGAA ATAACCGTGC  TGTTAATGAT TGGCTTCGGC TTCTGAGCAG  TCTTCTCAC CTCACCTGAG ACACCTTACT  CTAGGGCAA CCTAACTGTA GTAGGAAGAA  AATCAAAAGT AGAAAAACAG TTGAAACCAA  TGACAGGATC TATACTCCAT TAAAAGGCA  AGAATTTTGT TACCTGTAAT GATTCTTCTA</p>

			ACATTCCTAC GCTAAGATTT TACTAAAGAA GAAAATAACA GCAGAGGAAA GTGTTTCAGGC AGTCACTGCC ATGATGAAGC TGTCAGAATC TGAGAGCTAC TGCTGCAACT GATCGTGTAG TAAATCCAGC TGTAAGGGG ATCTTAACCC ACCACAGTGG GATGCACAGG CAGATCCCCA AGGGCATTGT GCAGCTGTGA GATATATATT TAAAGTTGTA TATAATGATT TTCTAATTTA TTCCGTGAGC ACCTTTGAAA ATATACATGT CGCTGTGTAA CAAATACACT TCTGAATAAA GTAATTCTCA AGTTC (SEQ ID NO: 37)
--	--	--	--

較長TSLP同功異型物1與氣管發炎疾病之出現有關(Headley等人, 2009, *Journal of immunology* 182, 1641-1647; Ying等人, 2005, *Journal of immunology* 174, 8183-8190)。如本文所用，術語「TSLP」係指TSLP同功異型物1。如本文所用，人類TSLP蛋白質亦涵蓋在全長上與GenBank寄存編號NP\_149024.1之胺基酸序列具有至少約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性之蛋白質。人類TSLP核酸序列在其全長上與GenBank寄存編號NM\_033035.4之核酸序列具有至少約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。鼠類、獼猴(cyno)及其他動物TSLP蛋白質之序列為此項技術中已知的(參見例如表1)。

如本文所用，術語「抗體」係指來源於特異性結合於抗原之免疫球蛋白分子的蛋白質或多肽序列。抗體可為多株或單株、多鏈或單鏈或完整免疫球蛋白且可來源於天然來源或重組來源。天然存在之「抗體」為包含藉由二硫鍵相互連接之至少兩條重(H)鏈及兩條輕(L)鏈的糖蛋白。各重鏈由重鏈可變區(在本文中縮寫為VH)及重鏈恆定區構成。重鏈恆定區由三個域

(CH1、CH2及CH3)構成。各輕鏈由輕鏈可變區(本文中縮寫為VL)及輕鏈恆定區構成。輕鏈恆定區由一個域(CL)構成。VH及VL區可進一步細分成高變區，稱為互補決定區(CDR)，穿插稱為構架區(FR)之更保守區。各VH及VL由自胺基端至羧基端按以下順序排列之三個CDR及四個FR組成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原相互作用之結合域。抗體之恆定區可介導免疫球蛋白與宿主組織或因子(包括免疫系統之各種細胞(例如效應細胞)及經典補體系統之第一組分(C1q))的結合。抗體可為單株抗體、人類抗體、人類化抗體、駱駝化抗體或嵌合抗體。抗體可具有任何同型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或子類。

如本文所用，術語抗體之「抗體片段」、「抗原結合片段」、「其抗原結合片段」、「抗原結合部分」及其類似物係指保留特異性結合於給定抗原(例如TSLP)之能力的完整抗體的一或多個片段。抗體之抗原結合功能可由完整抗體之片段執行。術語抗體之「抗原結合部分」內所涵蓋之結合片段的實例包括Fab片段，一種由VL、VH、CL及CH1域組成之單價片段；F(ab)<sub>2</sub>片段，一種包含在鉸鏈區藉由二硫橋鍵連接之兩個Fab片段之二價片段；由VH及CH1域組成之Fd片段；由抗體單臂之VL及VH域組成之Fv片段；單域抗體(dAb)片段(Ward等人, 1989 Nature 341:544-546)，其由VH域組成；及經分離之互補決定區(CDR)。此外，儘管Fv片段之兩個域(VL及VH)藉由獨立基因編碼，然而其可使用重組方法藉由人工肽連接子接合，該連接子能夠使其製造成VL及VH區成對以形成單價分子之單蛋白鏈(稱為單鏈Fv (scFv)；參見，例如Bird等人, 1988 Science 242:423-426；及Huston等人, 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883)。此類單鏈抗體

包括抗體之一或多個「抗原結合部分」。此等抗體片段使用熟習此項技術者已知之習知技術獲得，且以與完整抗體相同之方式來篩選供使用的片段。抗原結合部分亦可併入單域抗體、最大抗體、微型抗體、胞內抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、v-NAR及雙-scFv中(參見例如 Hollinger及Hudson, 2005, *Nature Biotechnology*, 23, 9, 1126-1136)。抗體之抗原結合部分可移植至基於諸如III型纖維結合蛋白(Fn3)之多肽的骨架中(參見美國專利第6,703,199號，其描述纖維結合蛋白多肽單功能抗體)。抗原結合部分可併入包含一對串聯Fv區段(VH-CH1-VH-CH1)之單鏈分子中，該等Fv區段連同互補輕鏈多肽形成一對抗原結合區(Zapata等人, 1995 *Protein Eng.* 8(10):1057-1062；及美國專利第5,641,870號)。

術語「抗原決定基」包括能夠特異性結合於免疫球蛋白或者以其他方式與分子相互作用之任何蛋白質決定子。抗原決定基決定子一般由諸如胺基酸或碳水化合物或糖側鏈之分子之化學活性表面基團組成，且通常具有特定三維結構特徵，以及荷質比特徵。抗原決定基可為「線性」或「構形」。構形抗原決定基與線性抗原決定基之區別在於，在變性溶劑存在下，與前者之結合消失，但與後者之結合未消失。

術語「互補位」之定義藉由將視角逆轉而來源於以上「抗原決定基」之定義。因此，如本文所用，術語「互補位」係指抗體或抗體片段上抗原特異性結合(亦即使得抗體或抗體片段與抗原實體接觸)之區域或區。

在X射線導出之晶體結構藉由抗體(例如Fab片段)與其抗原之間的複合物的空間座標定義的情形下，除非另外規定或上下文矛盾，否則術語互補位在本文中具體定義為藉由重質原子(亦即非氫原子)與目標抗原之重質原子在規定距離內(例如在4埃距離內)表徵之抗體殘基。

如本文所用，術語「互補決定區」及「CDR」係指抗體或抗原結合片段之負責抗原結合的胺基酸殘基。

如本文所用，術語「單價抗體」係指結合於目標分子上之單個抗原決定基的抗體。

如本文所用，術語「二價抗體」係指結合於至少兩個相同目標分子上之兩個抗原決定基的抗體。二價抗體亦可使目標分子彼此交聯。「二價抗體」亦指結合於至少兩個相同目標分子上之兩個不同抗原決定基的抗體。

術語「多價抗體」係指價數大於一之單個結合分子，其中「價數」描述為每分子抗體構築體所存在之抗原結合部分的數目。因此，單個結合分子可結合於目標分子上之大於一個結合位點。多價抗體之實例包括(但不限於)二價抗體、三價抗體、四價抗體、五價抗體及其類似物，以及雙特異性抗體及雙互補位抗體。舉例而言，對於TSLP，諸如TSLP雙互補位抗體之多價抗體將具有分別識別TSLP之兩個不同域的結合部分。

術語「多價抗體」亦指對兩個單獨目標分子具有大於一個抗原結合部分之單個結合分子。舉例而言，抗體結合於TSLP及並非TSLP之第二目標分子。在一個實施例中，多價抗體為具有四個抗原決定基結合域之四價抗體。四價分子可為雙特異性的且對目標分子上之每個結合位點呈二價。

如本文所用，術語「雙互補位抗體」係指結合於單個目標分子上之兩個不同抗原決定基的抗體。該術語亦包括結合於至少兩個目標分子之兩個域的抗體，例如四價雙互補位抗體。

如本文所用，術語「雙特異性抗體」係指結合於至少兩個不同目標上之兩個或大於兩個不同抗原決定基的抗體。

如本文所用，片語「單株抗體」或「單株抗體組合物」係指具有實質

上一致的胺基酸序列或來源於同一遺傳來源之多肽，包括抗體、雙特異性抗體等。此術語亦包括單一分子組成之抗體分子之製劑。單株抗體組合物展示對特定抗原決定基之單一結合特異性及親和力。

如本文所用，片語「人類抗體」包括可變區之構架區及CDR區均來源於人源序列之抗體。此外，若抗體含有恆定區，則恆定區亦來源於此類人類序列，例如人類生殖系序列，或人類生殖系序列或抗體之突變型，其含有來源於人類構架序列分析之共同構架序列，例如如Knappik等人(2000. *J Mol Biol* 296, 57-86)中所述。免疫球蛋白可變域(例如CDR)之結構及位置可使用熟知編號方案定義，例如Kabat編號方案、Chothia編號方案或Kabat及Chothia之組合(參見例如Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services (1991), Kabat等人編；Al Lazikani等人, (1997) *J. Mol. Bio.* 273:927-948)；Kabat等人, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, NIH公開號91-3242 U.S. Department of Health and Human Services；Chothia等人, (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917；Chothia等人, (1989) *Nature* 342:877-883；及Al-Lazikani等人, (1997) *J. Mol. Biol.* 273:927-948。

本發明之人類抗體可包括並非由人類序列編碼之胺基酸殘基(例如，藉由活體外無規或定點誘變或藉由活體內體細胞突變引入之突變，或有助於穩定性或製造之保守性取代)。然而，如本文所用，術語「人類抗體」並不意欲包括來源於另一哺乳動物物種(諸如小鼠)之生殖系的CDR序列已移植於人類構架序列上的抗體。

如本文所用，片語「重組人類抗體」包括藉由重組方式製備、表現、產生或分離的所有人類抗體，諸如自人類免疫球蛋白基因之轉殖基因或轉



殖染色體動物(例如小鼠)或自其製備之融合瘤中分離的抗體；自經轉型以表現人類抗體之宿主細胞(例如轉染瘤)中分離的抗體；自重組、組合人類抗體文庫中分離的抗體；及藉由任何其他方式(包括將人類免疫球蛋白基因序列之全部或一部分與其他DNA序列拼接)製備、表現、產生或分離的抗體。此類重組人類抗體具有構架區及CDR區來源於人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區。然而，在某些實施例中，此類重組人類抗體可進行活體外誘變(或當使用人類Ig序列之轉殖基因動物時，為活體內體細胞誘變)，且因此重組抗體之VH及VL區之胺基酸序列為雖然來源於人類生殖系VH及VL序列且與其相關，但活體內可不天然存在於人類抗體生殖系譜系內之序列。

如本文所用，術語「Fc區」係指包含抗體恆定域之CH3、CH2及鉸鏈區之至少一部分的多肽。視情況，Fc區可包括存在於一些抗體類別中之CH4域。Fc區可包含抗體恆定域之全部鉸鏈區。在一個實施例中，本發明包含抗體之Fc區及CH1區。在一個實施例中，本發明包含抗體之Fc區CH3區。在另一實施例中，本發明包含抗體恆定域之Fc區、CH1區及C $\kappa$ / $\lambda$ 區。在一個實施例中，本發明之結合分子包含恆定區，例如重鏈恆定區。在一個實施例中，此類恆定區與野生型恆定區相比經修飾。亦即，本文所揭示之本發明之多肽可包含對三個重鏈恆定域(CH1、CH2或CH3)及/或輕鏈恆定區域(CL)中之一或多者的更改或修飾。修飾實例包括一或多個域中之一或多個胺基酸的添加、缺失或取代。可包括此類變化以使效應功能、半衰期等最佳化。

如本文所用，術語「親和力」係指在單一抗原位點處抗體與抗原之間相互作用的強度。在各抗原位點內，抗體「臂」之可變區經由弱非共價力

與抗原在多個位點處相互作用；相互作用愈大，親和力愈強。如本文所用，對於IgG抗體或其片段(例如Fab片段)，術語「高親和力」係指抗體對於目標抗原具有 $10^{-8}$  M或小於 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M或小於 $10^{-9}$  M、或 $10^{-10}$  M、或 $10^{-11}$  M或小於 $10^{-11}$  M、或 $10^{-12}$  M或小於 $10^{-12}$  M、或 $10^{-13}$  M或小於 $10^{-13}$  M之分解力(knock down)。然而，對於其他抗體同型，高親和力結合可變化。舉例而言，對於IgM同型，高親和力結合係指抗體具有 $10^{-7}$  M或小於 $10^{-7}$  M、或 $10^{-8}$  M或小於 $10^{-8}$  M之分解力。

如本文所用，術語「親合力」係指抗體-抗原複合物之整體穩定性或強度的資訊性量度。其由三個主要因素控制：抗體抗原決定基親和力；抗原與抗體兩者之價數；以及相互作用部分之結構配置。最終，此等因素確定抗體之特異性，亦即特定抗體結合於精確抗原之抗原決定基的可能性。

如本文所用，術語「結合特異性」係指個別抗體組合位點與一種抗原決定子反應且不與不同抗原決定子反應之能力。抗體之組合位點位於分子之Fab部分且由重鏈及輕鏈之高變區構築。抗體之結合親和力為單個抗原決定子與抗體上單個組合位點之間的反應強度。其為抗原決定子與抗體組合位點之間作用的引力及斥力總和。

術語「治療(treat/treatment)」係指治療性治療及預防性或防治性措施，其中目標為預防或減緩不當生理變化或病症。出於本發明之目的，有益或所需臨床結果包括(但不限於)症狀緩解、疾病程度減輕、疾病病況穩定(亦即不惡化)、疾病進程延緩或減緩、疾病病況改善或緩和以及緩解(部分或完全)，無論可偵測或不可偵測。「治療」亦可意謂相較於不接受治療之預期存活期，存活期延長。

術語「個體」係指向其提供根據本發明方法之治療的動物、人類或非

人類。涵蓋獸醫學及非獸醫學應用。該術語包括(但不限於)哺乳動物，例如人類、其他靈長類、豬、嚙齒動物(諸如小鼠及大鼠、兔、天竺鼠、倉鼠)、牛、馬、貓、狗、綿羊及山羊。典型個體包括人類、農畜及家養寵物(諸如貓及狗)。

「有效量」係指足以實現有益或所需結果之量。舉例而言，治療量為實現所需治療作用之量。此量可與預防有效量相同或不同，預防有效量為預防疾病發作或疾病症狀所需要之量。有效量可以一或多次投藥、施用或劑量形式投與。治療性化合物之「治療有效量」(亦即有效劑量)視所選治療性化合物而定。可投與組合物例如每天一或多次至每週一或多次、至每月一或多次、至每年一或多次。熟習此項技術者應瞭解，某些因素可影響有效治療個體所需之劑量及時間安排，包括(但不限於)疾病或病症之嚴重程度、先前治療、個體之一般健康狀況及/或年齡及存在之其他疾病。此外，用治療有效量之本文所述之治療性化合物治療個體可包括單一治療或一系列治療。

術語「核酸」或「聚核苷酸」係指去氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其呈單股或雙股形式之聚合物。除非明確限制，否則該術語涵蓋含有天然核苷酸之已知類似物的核酸，該等已知類似物具有與參考研酸類似的結合特性且以與天然存在之核苷酸類似的方式代謝。除非另外指明，否則特定核酸序列亦隱含地涵蓋其經保守修飾之變異體(例如簡併密碼子取代)、對偶基因、直系同源物、SNP及互補序列以及明確指明之序列。特定言之，簡併密碼子取代可藉由產生一或多個所選(或所有)密碼子之第三位置經混合鹼基及/或去氧肌苷殘基取代之序列來實現(Batzer等人, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka等人, *J. Biol. Chem.*

260:2605-2608 (1985)；及Rossolini等人, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994))。

術語「肽」、「多肽」及「蛋白質」可互換使用，且係指包含由肽鍵共價連接之胺基酸殘基的化合物。蛋白質或肽必須含有至少兩個胺基酸，且對可構成蛋白質或肽序列之胺基酸的最大數目無限制。多肽包括任何包含藉由肽鍵彼此接合之兩個或大於兩個胺基酸的肽或蛋白質。如本文所用，該術語係指短鏈(其在此項技術中通常亦稱為例如肽、寡肽及寡聚物)及長鏈(其在此項技術中一般稱為蛋白質，其存在多種類型)。「多肽」尤其包括例如生物活性片段、實質上同源多肽、寡肽、均二聚體、雜二聚體、多肽變異體、經修飾多肽、衍生物、類似物、融合蛋白。多肽包括天然肽、重組肽或其組合。

術語「保守序列修飾」係指胺基酸修飾不顯著影響或改變含有該胺基酸序列之抗體或抗體片段的結合特徵。此類保守修飾包括胺基酸取代、添加及缺失。修飾可藉由此項技術中已知之標準技術(諸如定點誘變及PCR介導之誘變)引入本發明之抗體或抗體片段中。保守胺基酸取代為胺基酸殘基經具有類似側鏈之胺基酸殘基置換之取代。此項技術中已定義具有類似側鏈之胺基酸殘基家族。此等家族包括具有鹼性側鏈(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如天冬胺酸、麩胺酸)、不帶電極性側鏈(例如甘胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、非極性側鏈(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸)、 $\beta$ 分支鏈側鏈(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及芳族側鏈(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)之胺基酸。因此，本發明之分子(諸如抗體或抗體片段)內之一或多個胺基酸殘基可經來自相同側鏈家族之其

他胺基酸殘基置換，且經改變之分子可使用本文所述之功能性分析加以測試。

術語「同源」或「一致性」係指在兩個聚合分子之間，例如在諸如兩個DNA分子或兩個RNA分子之兩個核酸分子之間，或在兩個多肽分子之間的次單位序列一致性。當兩個分子中之次單元位置由相同單體次單元佔據時；例如若兩個DNA分子中之每一者中之位置均由腺嘌呤佔據，則其在彼位置處為同源或一致的。兩個序列之間的同源性為匹配或同源位置數目之直接函數；例如若兩個序列中之位置有一半(例如，長度為十個次單元之聚合物中之五個位置)同源，則該兩個序列為50%同源；若90%之位置(例如，10個中之9個)匹配或同源，則該兩個序列為90%同源。「序列一致性」之百分比可藉由在比較窗口比較兩個經最佳比對之序列來確定，其中比較窗口中之胺基酸序列之片段與兩個序列最佳比對之參考序列(其不包含添加或缺失)相比，可包含添加或缺失(例如空隙或懸垂物)。該百分比可如下計算：測定兩個序列中存在之一致胺基酸殘基的位置數，得到匹配位置數，將匹配位置數除以比較窗中之總位置數且將結果乘以100，得到序列一致性百分比。輸出為標的序列相對於查詢序列之一致性百分比。

術語「經分離」意謂自天然狀態改變或移除。舉例而言，天然存在於活動物中之核酸或肽並非「經分離」，但自其天然狀態之共存材料部分或完全分離之相同核酸或肽為「經分離」。經分離核酸或蛋白質可以實質上經純化之形式存在或可存在於諸如宿主細胞之非原生環境中。經分離抗體實質上不含具有不同抗原特異性之其他抗體(例如，特異性結合TSLP之經分離抗體實質上不含特異性結合除TSLP以外之抗原的抗體)。然而，特異性結合目標分子之經分離抗體可對來自其他物種之相同抗原具有交叉反應

性，例如特異性結合人類TSLP之經分離抗體可結合來自其他物種之TSLP分子。此外，經分離抗體可實質上不含其他細胞材料及/或化學物質。

在一些實施例中，本申請案之乾燥粉末調配物包含核殼粒子，該等核殼粒子包含：殼形成賦形劑及包含API、玻璃形成賦形劑及緩衝劑之核心，有時在本文中亦稱為平台調配物或殼核平台調配物。

如本文所用，術語「活性成分」、「治療活性成分」、「活性劑」、「藥物」或「原料藥」意謂醫藥之活性成分，亦稱為活性醫藥成分(API)。

如本文所用，術語「質量中值直徑」或「MMD」或「x50」意謂通常呈多分散粒子群體形式(亦即由一系列粒度組成)之複數個粒子的中值直徑。除非上下文另外指示，否則如本文所報導之MMD值藉由雷射繞射(Sympatec Helos, Clausthal-Zellerfeld, Germany)測定。相比之下， $d_g$ 表示單個粒子之幾何直徑。

如本文所用，術語「敲緊密度」或 $\rho_{敲緊}$ 係指根據如例如 [www.usp.org/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/USPNF/revisions/m99375-bulk\\_density\\_and\\_tapped\\_density\\_of\\_powders.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/m99375-bulk_density_and_tapped_density_of_powders.pdf)所述之方法I所量測之粒子密度。敲緊密度表示最接近的粒子密度近似值，其量測值比實際粒子密度小大致20%。

如本文所用，術語「皺」意謂具有許多皺折或褶痕，亦即脊形或起皺。

如本文所用，術語「皺度」為經工程改造之粒子的表面粗糙度的量度。出於本發明之目的，皺度由自BET量測獲得之比表面積、自氦比重瓶測定法獲得之真密度及藉由雷射繞射(Sympatec)獲得之表面積與體積比計算所得，即：

$$\text{皺度} = (SSA \cdot \rho_{真}) / S_v$$

其中 $S_v = 6/D_{32}$ ，其中 $D_{32}$ 為基於單位表面積之平均直徑。預期表面粗糙度增加減小粒子間內聚力且改良氣溶膠靶向肺。預期經改良之肺靶向減小患者間變異性及藥物在口咽及體循環中之含量。在一或多個實施例中，皺度 $S_v$ 為3至20，例如5至10。

如本文所用，術語「初始粒子之中值空氣動力學直徑」或 $D_a$ 由經由雷射繞射測定之粒子的初始幾何尺寸(x50)及其敲緊密度計算所得，即： $D_a = x50 (\rho_{敲緊})^{1/2}$ 。

如本文所用，術語「遞送劑量」或「DD」係指在粉末裝置之致動或分散事件之後，由吸入器裝置遞送乾燥粉末之示數。DD定義為由吸入器裝置遞送之劑量與標稱或定量劑量之比率。DD為以實驗方式測定之參數，且可使用模擬患者給藥之活體外裝置設定來測定。

如本文所用，術語「質量中值空氣動力學直徑」或「MMAD」係指通常呈多分散群體形式之複數個粒子的中值空氣動力學尺寸。「空氣動力學直徑」為一般在空氣中具有與粉末相同的沈降速度的單位密度球體的直徑，且因此為表徵氣溶膠化粉末或其他分散粒子或粒子調配物在其沈降行為方面之適用方式。空氣動力學粒度分佈(APSD)及MMAD在本文中藉由使用NEXT GENERATION IMPACTOR™之級聯碰撞來測定。一般而言，若粒子在空氣動力學方面太大，則較少粒子將到達深肺。若粒子太小，則可能呼出較大百分比之粒子。相比之下， $d_a$ 表示單個粒子之空氣動力學直徑。

如本文所用，術語「總肺劑量」(TLD)係指在4 kPa壓降下自乾燥粉末吸入器吸入粉末之後未沈積在理想化艾伯塔口-喉模型(Alberta mouth-throat model)中之活性成分百分比。資料可表示為標稱劑量或遞送

劑量之百分比。AIT表示普通成年個體上呼吸道之理想化版本。除非另外陳述，否則TLD在艾伯塔理想化喉模型中量測。關於AIT之資訊及實驗設定之詳細描述可見於：[www.copleyscientific.com](http://www.copleyscientific.com)。

如本文所用，術語「慣性參數」係指表徵上呼吸道中之慣性碰撞的參數。該參數由斯托克定律(Stoke's Law)推導出且等於 $d_a^2 Q$ ，其中 $d_a$ 為空氣動力學直徑，且 $Q$ 為體積流量。

如本文所用，術語「固體含量」係指溶解或分散於有待噴霧乾燥之液體溶液或分散液中之活性成分及賦形劑的濃度。

如本文所用，術語「ALR」為界定霧化器中所用空氣與液體比之製程參數。較小ALR值通常產生較大霧化液滴。

如本文所用，術語「粒子群體密度」(PPD)為由固體含量及霧化器液體流動速率之乘積除以總乾燥器氣體流動速率計算所得的無因次數。已觀測到PPD與初始幾何粒度相關。

### **TSLP結合分子**

本文提供特異性結合TSLP且抑制TSLP活性之分子，例如抗體或抗體片段，包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv及dAb片段、scFv、單域抗體、最大抗體、微型抗體、胞內抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、v-NAR及雙-SCFv。此等分子適用於治療TSLP相關發炎性病狀，包括哮喘及慢性阻塞性肺病。由於TSLP為Th2效應細胞激素上游之關鍵結點細胞激素，故抑制TSLP可同時阻斷多個下游Th2效應子(例如IL-4、IL-5、IL-13)且亦可影響非Th2介導之路徑(例如IL-17、IFN- $\gamma$ )。

### **TSLP抗體及TSLP結合抗體片段**

在一些實施例中，本發明提供特異性結合於人類TSLP之抗體及抗體



片段。TSLP抗體及抗體片段包括(但不限於)如本文(包括實例中)所述產生之人類及人類化單株抗體及抗體片段。在一些實施例中，本發明提供一種經分離抗體或其抗原結合片段，其以小於100 pM之解離常數( $K_D$ )，例如小於90 pM、小於80 pM、小於70 pM、小於60 pM、小於50 pM、小於40 pM、小於30 pM、小於20 pM、小於10 pM之 $K_D$ 結合人類TSLP。在一些實施例中，本文所提供之經分離抗體或抗原結合片段以小於10 pM之解離常數( $K_D$ )結合人類TSLP。

在一些實施例中，本文所提供之TSLP結合分子包括重鏈CDR1、重鏈CDR2、重鏈CDR3及輕鏈CDR1、輕鏈CDR2及輕鏈CDR3。在一些實施例中，本文所提供之TSLP結合分子包括包含CDR1、CDR2及CDR3之重鏈可變區及包含CDR1、CDR2及CDR3之輕鏈可變區。在一些實施例中，本文所提供之TSLP結合分子包括全長重鏈序列及全長輕鏈序列。在一些實施例中，該分子為TSLP結合Fab。

表2列出示例性TSLP結合抗體及Fab之序列，其皆以高親和力結合於人類TSLP。舉例而言，抗TSLP Fab1以6 pM之解離常數( $K_D$ )結合於重組人類TSLP。在一些實施例中，抗TSLP Fab1分別以 $5.0 \pm 2.0$  pM及 $1.4 \pm 0.6$  pM之 $K_D$ 值結合於人類及食蟹獼猴TSLP蛋白質。

**表2. 抗TSLP Fab及抗體之胺基酸序列**

抗TSLP mAb1		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (組合)	GFTFSDYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (組合)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (組合)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Kabat)	DYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 5	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
SEQ ID NO: 6	HCDR2 (Chothia)	KSKTDAGT
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Chothia)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 7	VH	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSDY

		WMHWVRQAPGKGLEWVGHKSKTDAGTTDY AAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCAREIYYYAFDSWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 8	VH DNA	GAGGTT CAGCTGGT GGAATCAGGCGGCGGA CTGGTTAAGCCTGGCGGTAGCCTTAGACTTA GCTGCGCTGCTAGTGGCTTACCTTTAGCGA CTACTGGATGCACTGGGTTAGACAGGCCCT GGTAAAGGCTTGGAGTGGGTCGGACACATTA AGTCTAAGACCGACGCCGGCACTACCGACTA CGCCGCTCCCGTTAAGGGCCGGTTCCTATC TCTAGGGACGACTCTAAGAACCCTCTACC TTCAAATGAATAGCCTTAAGACCGAGGACAC CGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAAATCTAC TACTACGCCTTCGATAGCTGGGGTCAAGGCA CCCTCGTGACCGTGTCTAGC
SEQ ID NO: 9	重鏈	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDY WMHWVRQAPGKGLEWVGHKSKTDAGTTDY AAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCAREIYYYAFDSWGQGLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSPG K
SEQ ID NO: 10	重鏈DNA	GAGGTT CAGCTGGT GGAATCAGGCGGCGGA CTGGTTAAGCCTGGCGGTAGCCTTAGACTTA GCTGCGCTGCTAGTGGCTTACCTTTAGCGA CTACTGGATGCACTGGGTTAGACAGGCCCT GGTAAAGGCTTGGAGTGGGTCGGACACATTA AGTCTAAGACCGACGCCGGCACTACCGACTA CGCCGCTCCCGTTAAGGGCCGGTTCCTATC TCTAGGGACGACTCTAAGAACCCTCTACC TTCAAATGAATAGCCTTAAGACCGAGGACAC CGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAAATCTAC TACTACGCCTTCGATAGCTGGGGTCAAGGCA CCCTCGTGACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAA GGGCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGC AGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCC TGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGA GCCCGTGACAGTGTCTGGA ACTCTGGGGCT CTGACTTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCG TGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAG CAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTG GGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA

		GAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCC ACACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACT GCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCCTGTTCCCC CCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAG GACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGAC GTGTCCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACA ACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGT ACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCT GACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC AAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAG GCCCTGCCAGCCCAATCGAAAAGACAATCA GCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCC AGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT CTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGATATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCG AGAACAATAACAAGACCACCCCCAGTGCT GGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGC AAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGC ACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA GTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (組合)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (組合)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (組合)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Kabat)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Kabat)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Kabat)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 14	LCDR1 (Chothia)	DNIGSKY
SEQ ID NO: 15	LCDR2 (Chothia)	GDN
SEQ ID NO: 16	LCDR3 (Chothia)	ADWVDFY
SEQ ID NO: 17	VL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYVH WYQQKPGQAPVLVIIYGDNERPSGIPERFSGSNS GNTATLTISRAGDEADYYCQAADWVDFYV FGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 18	VL DNA	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTTAGCGTTA GCGTGGCCCTGGGTCAAACCGCTAGAATCAC CTGTAGCGGCGATAATATCGGCTCTAAATAC GTTCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAAG CCCCCGTGCTCGTGATCTACGGCGATAACGA GCGGCCTAGCGGAATCCCCGAGCGGTTTAGC GGCTCTAATAGCGGTAACACCGCTACCCTGA CTATCTCTAGGGCTCAGGCCGGCGACGAGGC CGACTACTACTGTCAGGCCGCGACTGGGTG GACTTCTACGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAGC TGACCGTGCTG
SEQ ID NO: 19	輕鏈	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYVH WYQQKPGQAPVLVIIYGDNERPSGIPERFSGSNS GNTATLTISRAGDEADYYCQAADWVDFYV

		FGGGTKLTVLGGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 20	輕鏈DNA	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTTAGCGTTA GCGTGGCCCTGGGTCAAACCGCTAGAATCAC CTGTAGCGGCGATAATATCGGCTCTAAATAC GTTCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAAG CCCCCGTGCTCGTGATCTACGGCGATAACGA GCGGCCTAGCGGAATCCCCGAGCGGTTTAGC GGCTCTAATAGCGGTAACACCGCTACCCTGA CTATCTCTAGGGCTCAGGCCGGCGACGAGGC CGACTACTACTGTCAGGCCGCCGACTGGGTG GACTTCTACGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAGC TGACCGTGCTGGGTCAACCTAAGGCTGCCCC CAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAG GAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGT GCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGT GACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCC CGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCC AGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCC AGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCGAGCAGT GGAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGT GACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGAC CGTGGCCCCAACCAGGTGCAGC
<b>抗TSLP Fab1</b>		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (組合)	GFTFSDYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (組合)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (組合)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Kabat)	DYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 5	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
SEQ ID NO: 6	HCDR2 (Chothia)	KSKTDAGT
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Chothia)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 7	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDY WMHWVRQAPGKGLEWVGHKSKTDAGTTDY AAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDA VYYCAREIYYAFDSWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO: 21	VH DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCAGGCGGCGGA CTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGA GCTGCGCTGCTAGTGGCTTACCTTTAGCGA CTACTGGATGCACTGGGTCAGACAGGCCCT GGTAAAGGCCTGGAGTGGGTCGGACACATTA AGTCTAAGACCGACGCCGGCACTACCGACTA CGCCGCTCCTGTGAAGGGCCGGTTCCTACTATC TCTAGGGACGACTCTAAGAACACCCTGTACC TGCAGATGAATAGCCTGAAAACCGAGGACA CCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGATCTA CTACTACGCCTTCGATAGCTGGGGTCAGGGC

		ACCCTGGTCACCGTGTCTAGC
SEQ ID NO: 22	重鏈	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDY WMHWVRQAPGKGLEWVGHKSKTDAGTTDY AAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDA VYYCAREIYYYAFDSWGQGLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO: 23	重鏈DNA	GAGGTGCAGCTGGTGAATCAGGCGGCGGA CTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGA GCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTTAGCGA CTACTGGATGCACTGGGTGAGACAGGCCCT GGTAAAGGCCTGGAGTGGGTGCGACACATTA AGTCTAAGACCGACGCCGGCACTACCGACTA CGCCGCTCCTGTGAAGGGCCGGTTCACCTATC TCTAGGGACGACTCTAAGAACCCTGTACC TGCAGATGAATAGCCTGAAAACCGAGGACA CCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGATCTA CTACTACGCCTTCGATAGCTGGGGTCAGGGC ACCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTA AGGGCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTCC AGCAAGTCTACCTCTGGCGGCACCGCTGCTC TGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGA GCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTGCGGCC CTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCG TGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCC TCCGTGGTGACAGTGCCTTCCCTCCAGCCTGG GCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCA CAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCG GGTGGAGCCTAAGTCATGC
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (組合)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (組合)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (組合)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Kabat)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Kabat)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Kabat)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 14	LCDR1 (Chothia)	DNIGSKY
SEQ ID NO: 15	LCDR2 (Chothia)	GDN
SEQ ID NO: 16	LCDR3 (Chothia)	ADWVDFY
SEQ ID NO: 17	VL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYVH WYQQKPGQAPVLYIYGDNERPSGIPERFSGSNS GNTATLTISRAGDEADYYCQAADWVDFYV FGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 24	VL DNA	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTGAGCGTCA GCGTGGCCCTGGGTGAGACCGCTAGAATCAC CTGTAGCGGCGATAATATCGGCTCTAAATAC GTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAGG CCCCCGTGTGGTGTCTACGGCGATAACGA GCGGCCTAGCGGAATCCCCGAGCGGTTAGC GGCTCTAATAGCGGTAACACCGCTACCCTGA

		CTATCTCTAGGGCTCAGGCCGGCGACGAGGC CGACTACTACTGTCAGGCCGCCGACTGGGTG GACTTCTACGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAGC TGACCGTGCTG
SEQ ID NO: 25	輕鏈	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYVH WYQQKPGQAPVLYIGDNERPSGIPERFSGSNS GNTATLTISRAGQAGDEADYYCQAADWVDFYV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 26	輕鏈DNA	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTGAGCGTCA GCGTGGCCCTGGGTTCAGACCGCTAGAATCAC CTGTAGCGGCGATAATATCGGCTCTAAATAC GTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAGG CCCCGTGCTGGTGATCTACGGCGATAACGA GCGGCCTAGCGGAATCCCCGAGCGGTTTAGC GGCTCTAATAGCGGTAACACCGCTACCCTGA CTATCTCTAGGGCTCAGGCCGGCGACGAGGC CGACTACTACTGTCAGGCCGCCGACTGGGTG GACTTCTACGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAGC TGACCGTGCTGGGTTCAGCCTAAGGCTGCCCC CAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAG GAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGT GCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGT GACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCC CGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCC AGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCC AGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCGAGCAGT GGAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGT GACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGAC CGTGGCCCCAACCGAGTGCAGC

在一些實施例中，抗體包含具有表2中所列出的VH CDR中之任一者之胺基酸序列的VH CDR。詳言之，本發明提供特異性結合於TSLP蛋白質之抗體，該等抗體包含一個、兩個、三個、四個、五個或六個具有表2中所列出的VH CDR中之任一者之胺基酸序列的VH CDR (或者由其組成)。本發明亦提供特異性結合於TSLP蛋白質之抗體，該等抗體包含具有表2中所列出的VL CDR中之任一者之胺基酸序列的VL CDR。詳言之，本發明提供特異性結合於TSLP蛋白質之抗體，該等抗體包含一個、兩個、三個、四個、五個或六個具有表2中所列出的VL CDR中之任一者之胺基酸序列的VL CDR (或者由其組成)。

本發明亦提供包含表2中列出的VH胺基酸序列(或者由其組成)之抗體及其抗原結合片段，其中構架序列(例如不為CDR之序列)中不超過約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個胺基酸已突變(其中作為各種非限制性實例，突變為添加、取代或缺失)。

本發明亦提供特異性結合於TSLP之抗體及其抗原結合片段，該等抗體或其抗原結合片段包含表2中列出的VL胺基酸序列(或者由其組成)，其中構架序列(例如不為CDR之序列)中不超過約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20個胺基酸已突變型(其中作為各種非限制性實例，突變為添加、取代或缺失)。

本發明之其他抗體及其抗原結合片段包括已突變但在CDR區中仍與表2中所述之序列中所描繪之CDR區具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%一致性的胺基酸，且能夠結合於TSLP。在一個態樣中，本發明之其他抗體及其抗原結合片段包括突變胺基酸序列，其中當與表2中所述之序列中所描繪之CDR區相比時，CDR區中不超過1、2、3、4或5個胺基酸已突變。

本發明亦提供編碼特異性結合於TSLP蛋白質之抗體及其抗原結合片段的VH、VL、全長重鏈及全長輕鏈的核酸序列。此類核酸序列可經最佳化以在哺乳動物細胞中表現。

其他TSLP抗體及其抗原結合片段包括其中胺基酸或編碼胺基酸之核酸已突變、但仍與表2中所述之序列具有至少60、70、80、90或95%一致性的TSLP抗體及其抗原結合片段。在一個實施例中，該等抗體及其抗原結合片段包括突變胺基酸序列，其中當與表2中所述之序列中所描繪之可變區相比時，可變區中不超過1、2、3、4或5個胺基酸已突變，然而仍保留實

質上相同的治療活性。

由於本文所揭示之抗體中之每一者可結合於TSLP，故VH、VL、全長輕鏈及全長重鏈序列(胺基酸序列及編碼胺基酸序列之核苷酸序列)可「經混合及匹配」以形成本發明之其他TSLP結合抗體及其抗原結合片段。此類「經混合及匹配」之TSLP結合抗體可使用此項技術中已知的結合分析(例如ELISA及實例部分中所述之其他分析)來測試。當此等鏈經混合及匹配時，來自特定VH/VL對之VH序列應經結構上類似之VH序列置換。同樣，來自特定全長重鏈/全長輕鏈對之全長重鏈序列應經結構上類似之全長重鏈序列置換。同樣，來自特定VH/VL對之VL序列應經結構上類似之VL序列置換。同樣，來自特定全長重鏈/全長輕鏈對之全長輕鏈序列應經結構上類似之全長輕鏈序列置換。

在另一態樣中，本發明提供TSLP結合抗體，其包含如表2中所述之重鏈及輕鏈CDR1、CDR2及CDR3或其組合。CDR區係使用Kabat系統(Kabat等人 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH公開號91-3242)或使用Chothia系統(Chothia等人 1987 J. Mol. Biol. 196: 901-917; 及Al-Lazikani等人 1997 J. Mol. Biol. 273: 927-948)來劃定。或者可使用其他劃定CDR區之方法。舉例而言，Kabat及Chothia之CDR定義可經組合。

鑒於此等抗體中之每一者可結合於TSLP且抗原結合特異性主要由CDR1、2及3區提供，因此VH CDR1、2及3序列與VL CDR1、2及3序列可「經混合及匹配」(亦即來自不同抗體之CDR可經混合及匹配，但各抗體必須含有VH CDR1、2及3以及VL CDR1、2及3以產生本發明之其他TSLP結合結合分子。此類「經混合及匹配」之TSLP結合抗體可使用此項技術中已



知的結合分析及實例中所述之結合分析(例如ELISA)來測試。當VH CDR序列經混合及匹配時，來自特定VH序列之CDR1、CDR2及/或CDR3序列應經結構上類似之CDR序列置換。同樣，當VL CDR序列經混合及匹配時，來自特定VL序列之CDR1、CDR2及/或CDR3序列應經結構上類似之CDR序列置換。一般技術者將顯而易知，新穎的VH及VL序列可藉由用來自本文中針對本發明之單株抗體展示之CDR序列的結構上類似之序列使一或多個VH及/或VL CDR區序列突變來產生。

因此，本發明提供一種經分離單株抗體或其抗原結合片段，其包含具有選自SEQ ID NO: 1、4或5中之任一者之胺基酸序列的重鏈可變區CDR1 (HCDR1)；具有選自SEQ ID NO: 2或6中之任一者之胺基酸序列的重鏈可變區CDR2 (HCDR2)；具有SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的重鏈可變區CDR3 (HCDR3)；具有選自SEQ ID NO: 11或14中之任一者之胺基酸序列的輕鏈可變區CDR1 (LCDR1)；具有選自SEQ ID NO: 12或15中之任一者之胺基酸序列的輕鏈可變區CDR2 (LCDR2)；及具有選自SEQ ID NO: 13或16中之任一者之胺基酸序列的輕鏈可變區CDR3 (LCDR3)；其中該抗體或抗體片段特異性結合TSLP。

在一些實施例中，特異性結合於TSLP之抗體或抗體片段為表2中所述之抗體或抗體片段。

在一些實施例中，本發明提供一種經分離抗體或其抗原結合片段，其結合人類TSLP且包含SEQ ID NO: 4、2及3分別對應之HCDR1、HCDR2及HCDR3序列，及SEQ ID NO: 11、12及13分別對應之LCDR1、LCDR2及LCDR3序列。

在一些實施例中，本發明提供一種經分離抗體或其抗原結合片段，其

結合人類TSLP且包含SEQ ID NO: 5、6及3分別對應之HCDR1、HCDR2及HCDR3序列，及SEQ ID NO: 14、15及16分別對應之LCDR1、LCDR2及LCDR3序列。

在一些實施例中，本發明提供一種經分離抗體或其抗原結合片段，其結合人類TSLP且包含SEQ ID NO: 1、2及3分別對應之HCDR1、HCDR2及HCDR3序列，及SEQ ID NO: 11、12及13分別對應之LCDR1、LCDR2及LCDR3序列。

在一些實施例中，本發明提供一種經分離抗體或其抗原結合片段，其結合人類TSLP且包含含有胺基酸序列SEQ ID NO: 7之VH及含有胺基酸序列SEQ ID NO: 17之VL。

在一些實施例中，本發明提供一種經分離抗體或其抗原結合片段，其結合人類TSLP且包含含有胺基酸序列SEQ ID NO: 22之重鏈及含有胺基酸序列SEQ ID NO: 25之輕鏈。

在一些實施例中，本發明提供一種經分離抗體或其抗原結合片段，其結合人類TSLP且包含含有胺基酸序列SEQ ID NO: 9之重鏈及含有胺基酸序列SEQ ID NO: 19之輕鏈。

如本文所用，人類抗體包含重鏈或輕鏈可變區或全長重鏈或輕鏈，若抗體之可變區或全長鏈獲自使用人類生殖系免疫球蛋白基因之系統，則其為特定生殖系序列「之產物」或「來源於」特定生殖系序列。此類系統包括用所關注之抗原使攜帶人類免疫球蛋白基因之轉殖基因小鼠免疫或用所關注之抗原篩選呈現在噬菌體上之人類免疫球蛋白基因文庫。作為人類生殖系免疫球蛋白序列「之產物」或「來源於」人類生殖系免疫球蛋白序列之人類抗體可藉由將人類抗體之胺基酸序列與人類生殖系免疫球蛋白之胺

基酸序列進行比較且選擇序列最接近(亦即最大%一致性)人類抗體序列之人類生殖系免疫球蛋白序列來如此鑑別。與生殖系序列相比，作為特定人類生殖系免疫球蛋白序列「之產物」或「來源於」特定人類生殖系免疫球蛋白序列之人類抗體可含有胺基酸差異，其歸因於例如天然存在之體細胞突變或有意引入之定點突變。然而，在VH或VL構架區中，所選人類抗體通常在胺基酸序列上與由人類生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列至少90%一致，且含有當與其他物種之生殖系免疫球蛋白胺基酸序列(例如鼠類生殖系序列)相比時鑑別人類抗體為人類的胺基酸殘基。在某些情況下，人類抗體可在胺基酸序列上與由生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列至少60%、70%、80%、90%、或至少95%、或甚至至少96%、97%、98%或99%一致。通常，重組人類抗體將在VH或VL構架區中呈現異於由人生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列之不超過10個胺基酸差異。在某些情況下，人類抗體可呈現異於由生殖系免疫球蛋白基因編碼之胺基酸序列之不超過5個，或甚至不超過4、3、2或1個胺基酸差異。

### 同源抗體

在另一實施例中，本發明提供一種包含與表2中所述之序列同源之胺基酸序列的抗體或其抗原結合片段，且該抗體結合於TSLP並保留表2中所述之彼等抗體的所需功能特性。

舉例而言，本發明提供一種經分離單株抗體(或其抗原結合片段)，其包含重鏈可變區(VH)及輕鏈可變區(VL)，其中VH包含與選自由SEQ ID NO: 7組成之群之胺基酸序列至少80%、至少90%或至少95%一致的胺基酸序列；VL包含與選自由SEQ ID NO: 17組成之群之胺基酸序列至少80%、至少90%或至少95%一致的胺基酸序列；該抗體特異性結合於TSLP蛋白質

且抑制TSLP。

在一個實施例中，VH及/或VL胺基酸序列可與表2中闡述之序列50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。在一個實施例中，除不超過1、2、3、4或5個胺基酸位置中之胺基酸取代外，VH及/或VL胺基酸序列可一致。具有與表2中所述之抗體的VH及VL區具有高(亦即80%或大於80%)一致性之VH及VL區的抗體可藉由分別編碼SEQ ID NO: 8或21或SEQ ID NO: 18或24之核酸分子的誘變(例如定點或PCR介導之誘變)，接著使用本文所述之功能分析測試編碼改變之抗體的保留功能來獲得。

在一個實施例中，全長重鏈及/或全長輕鏈胺基酸序列可與表2中闡述之序列50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。具有與SEQ ID NO: 9之全長重鏈及SEQ ID NO: 19之全長輕鏈具有高(亦即80%或大於80%)一致性之全長重鏈及全長輕鏈的抗體可藉由分別編碼此類多肽之核酸分子的誘變(例如定點或PCR介導之誘變)，接著使用本文所述之功能分析測試編碼改變之抗體的保留功能來獲得。

在一個實施例中，全長重鏈及/或全長輕鏈核苷酸序列可與表2中闡述之序列60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。

在一個實施例中，重鏈及/或輕鏈核苷酸序列之可變區可與表2中闡述之序列60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。

如本文所用，兩個序列之間的一致性百分比為序列所共有之一致位置數的函數(亦即，%一致性等於一致位置數/總位置數×100)，考慮到為了兩個序列之最佳比對而需要引入的空隙數及各空隙之長度。序列比較及確定兩個序列之間的一致性百分比可使用數學演算法來達成，如下文非限制性

實例中所述。

另外或替代地，本發明之蛋白質序列可進一步用作「查詢序列」以對公共資料庫進行搜尋，例如鑑別相關序列。舉例而言，此類搜尋可使用 Altschul 等人, 1990 J. Mol. Biol. 215:403-10 之 BLAST 程式(2.0 版)進行。

### 具有保守修飾之抗體

在一些實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段具有包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列之重鏈可變區及包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列之輕鏈可變區，其中此等 CDR 序列中之一或多者具有基於本文所述之抗體的指定胺基酸序列或其保守修飾，且其中該等抗體保留本發明之 TSLP 結合抗體及其抗原結合片段的所需功能特性。因此，本發明提供一種經分離單株抗體或其抗原結合片段，其由包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列之重鏈可變區及包含 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列之輕鏈可變區組成，其中：重鏈可變區 CDR1 包含選自 SEQ ID NO: 1、4 或 5 中之任一者之胺基酸序列或其保守變異體；重鏈可變區 CDR2 包含選自 SEQ ID NO: 2 或 6 中之任一者之胺基酸序列或其保守變異體；重鏈可變區 CDR3 包含 SEQ ID NO: 3 之胺基酸序列或其保守變異體；輕鏈可變區 CDR1 包含選自 SEQ ID NO: 11 或 14 中之任一者之胺基酸序列或其保守變異體；輕鏈可變區 CDR2 包含選自 SEQ ID NO: 12 或 15 中之任一者之胺基酸序列或其保守變異體；及輕鏈可變區 CDR3 包含選自 SEQ ID NO: 13 或 16 中之任一者之胺基酸序列或其保守變異體；該抗體或其抗原結合片段特異性結合於 TSLP 且抑制 TSLP。

在一些實施例中，本發明之抗體或其抗原結合片段具有重鏈可變區及輕鏈可變區，其中該等重鏈及輕鏈可變區具有基於本文所述之抗體的指定胺基酸序列或其保守修飾，且其中該等抗體保留本發明之 TSLP 結合抗體及

其抗原結合片段的所需功能特性。因此，本發明提供一種經分離單株抗體或其抗原結合片段，其由重鏈可變區及輕鏈可變區組成，其中：重鏈可變區包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列或其保守變異體；輕鏈可變區包含SEQ ID NO: 17之胺基酸序列或其保守變異體；該抗體或其抗原結合片段特異性結合於TSLP且抑制TSLP。

### 結合於相同抗原決定基之抗體

本發明提供與表2中所列出的TSLP結合抗體或抗體片段結合於相同抗原決定基的抗體。額外抗體可因此基於其與本發明之其他抗體及其抗原結合片段交叉競爭(例如以統計學上顯著之方式競爭性抑制其結合)之能力在TSLP結合分析中鑑別。測試抗體抑制本發明之抗體及其抗原結合片段結合於TSLP蛋白質之能力表明測試抗體可與彼抗體競爭結合於TSLP；根據非限制性理論，此類抗體可與同其競爭之抗體結合於TSLP上相同或相關(例如結構上類似或空間上鄰近)的抗原決定基。在一些實施例中，與本文所揭示之抗體及其抗原結合片段結合於TSLP上相同的抗原決定基的抗體為人類單株抗體。此類人類單株抗體可如本文所述製備及分離。在一些實施例中，與本發明之抗體及其抗原結合片段結合於TSLP上相同的抗原決定基的抗體為小鼠單株抗體。在某些實施例中，與本文所揭示之抗體及其抗原結合片段結合於TSLP上相同的抗原決定基的抗體為來源於小鼠單株抗體之人類化單株抗體。在某一實施例中，與本文所揭示之抗體及其抗原結合片段結合於TSLP上相同的抗原決定基的抗體為人類化單株抗體。此類人類化單株抗體可如本文所述製備及分離。

在一些實施例中，本文所提供之單株抗體或其抗原結合片段特異性結合人類TSLP之抗原決定基，其中該抗原決定基包含以下殘基中之一或多

者：SEQ ID NO: 38之Lys38、Ala41、Leu44、Ser45、Thr46、Ser48、Lys49、Ile52、Thr53、Ser56、Gly57、Thr58、Lys59、Lys101、Gln145及Arg149。在一些實施例中，本文所提供之單株抗體或其抗原結合片段特異性結合人類TSLP之抗原決定基，其中該抗原決定基包含至少一個、至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個、至少六個、至少七個、至少八個、至少九個、至少十個、至少十一個、至少十二個、至少十三個、至少十四個、至少十五個或所有以下殘基：SEQ ID NO: 38之Lys38、Ala41、Leu44、Ser45、Thr46、Ser48、Lys49、Ile52、Thr53、Ser56、Gly57、Thr58、Lys59、Lys101、Gln145及Arg149。

在一些實施例中，本文所提供之單株抗體或其抗原結合片段特異性結合人類TSLP之抗原決定基，其中該抗原決定基包含至少一個、至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個、至少六個、至少七個、至少八個或所有以下殘基：SEQ ID NO: 38之Lys38、Ala41、Leu44、Ser45、Thr46、Ser48、Lys49、Ile52及Thr53。此類單株抗體或其抗原結合片段之抗原決定基亦可包括以下殘基中之一或多者：SEQ ID NO: 38之Ser56、Gly57、Thr58、Lys59、Lys101、Gln145及Arg149。

在一些實施例中，本文所提供之單株抗體或其抗原結合片段特異性結合人類TSLP之抗原決定基，其中該抗原決定基包含至少一個、至少兩個、至少三個或所有以下殘基：SEQ ID NO: 38之Ser56、Gly57、Thr58及Lys59。此類單株抗體或其抗原結合片段之抗原決定基亦可包括以下殘基中之一或多者：SEQ ID NO: 38之Lys38、Ala41、Leu44、Ser45、Thr46、Ser48、Lys49、Ile52、Thr53、Lys101、Gln145及Arg149。

在一些實施例中，本文所提供之單株抗體或其抗原結合片段特異性結

合人類TSLP之抗原決定基，其中該抗原決定基包含SEQ ID NO: 38之Lys101。此類單株抗體或其抗原結合片段之抗原決定基亦可包括以下殘基中之一或多者：SEQ ID NO: 38之Lys38、Ala41、Leu44、Ser45、Thr46、Ser48、Lys49、Ile52、Thr53、Ser56、Gly57、Thr58、Lys59、Gln145及Arg149。

在一些實施例中，本文所提供之單株抗體或其抗原結合片段特異性結合人類TSLP之抗原決定基，其中該抗原決定基包含SEQ ID NO: 38之Gln145或Arg149。在一些實施例中，本文所提供之單株抗體或其抗原結合片段特異性結合人類TSLP之抗原決定基，其中該抗原決定基包含SEQ ID NO: 38之Gln145及Arg149。此類單株抗體或其抗原結合片段之抗原決定基亦可包括以下殘基中之一或多者：SEQ ID NO: 38之Lys38、Ala41、Leu44、Ser45、Thr46、Ser48、Lys49、Ile52、Thr53、Ser56、Gly57、Thr58、Lys59及Lys101。

在一些實施例中，本文所提供之單株抗體或其抗原結合片段特異性結合人類TSLP之抗原決定基，其中該抗原決定基包含至少一個、至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個、至少六個或所有以下殘基：SEQ ID NO: 38之Lys49、Ile52、Gly57、Lys59、Lys101、Gln145及Arg149。在一些實施例中，本文所提供之單株抗體或其抗原結合片段特異性結合人類TSLP之抗原決定基，其中該抗原決定基包含所有以下殘基：SEQ ID NO: 38之Lys49、Ile52、Gly57、Lys59、Lys101、Gln145及Arg149。

在一些實施例中，本文所提供之單株抗體或其抗原結合片段特異性結合人類TSLP之抗原決定基，其中該抗原決定基包含SEQ ID NO: 38之以下各組殘基中之至少一者：(a) Lys49及Ile52、(b) Gly57及Lys59、(c)



Lys101、(d) Gln145及Arg149。在一些實施例中，本文所提供之單株抗體或其抗原結合片段特異性結合人類TSLP之抗原決定基，其中該抗原決定基包含SEQ ID NO: 38之Lys49及Ile52。在一些實施例中，本文所提供之單株抗體或其抗原結合片段特異性結合人類TSLP之抗原決定基，其中該抗原決定基包含SEQ ID NO: 38之Gly57及Lys59。在一些實施例中，本文所提供之單株抗體或其抗原結合片段特異性結合人類TSLP之抗原決定基，其中該抗原決定基包含SEQ ID NO: 38之Lys101。在一些實施例中，本文所提供之單株抗體或其抗原結合片段特異性結合人類TSLP之抗原決定基，其中該抗原決定基包含SEQ ID NO: 38之Gln145及Arg149。

在一些實施例中，TSLP結合分子可包含具有至少一個、至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個、至少六個、至少七個、至少八個、至少九個、至少十個、至少十一個、至少十二個、至少十三個、至少十四個、至少十五個、至少十六個、至少十七個、至少十八個、至少十九個或所有以下殘基之互補位：重鏈序列SEQ ID NO: 22之Thr28、Asp31、Tyr32、Trp33、Asp56、Glu101、Ile102、Tyr103、Tyr104、Tyr105或輕鏈序列SEQ ID NO: 25之Gly28、Ser29、Lys30、Tyr31、Tyr48、Asp50、Asn51、Glu52、Asn65及Trp92。

一旦確定抗原上之所需抗原決定基，則可例如使用本發明中所述之技術產生針對該抗原決定基之抗體。或者，在探索過程期間，抗體之產生及表徵可闡明關於所需抗原決定基之資訊。根據此資訊，隨後可競爭性篩選結合於相同抗原決定基之抗體。一種達成此舉之方法為進行交叉競爭研究，以尋找彼此競爭性結合之抗體，例如競爭結合於抗原之抗體。基於交叉競爭將抗體「分格」之高通量方法描述於國際專利申請案第WO 2003/48731號中。如熟習此項技術者應瞭解，實際上抗體可特異性結合之

任何事物均可為抗原決定基。抗原決定基可包含抗體結合之彼等殘基。

一般而言，特異性針對特定目標抗原之抗體將優先識別蛋白質及/或大分子之複合混合物中目標抗原上之抗原決定基。

包括抗原決定基之給定多肽區可使用此項技術中熟知之多種抗原決定基定位技術鑑別。參見例如*Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, 第66卷 (Glenn E. Morris編, 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey。舉例而言，線性抗原決定基可如下測定：藉由例如在固體支撐物上並行合成大量肽，該等肽對應於蛋白質分子之部分，且使該等肽與抗體反應，而該等肽仍附接於支撐物。此類技術為此項技術中已知的且描述於例如美國專利第4,708,871號；Geysen等人, (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8:3998-4002；Geysen等人, (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:78-182；Geysen等人, (1986) *Mol. Immunol.* 23:709-715中。類似地，構形抗原決定基為容易藉由測定胺基酸TSLP之空間構形來鑑別，諸如藉由例如氫/氘交換、X射線結晶學及二維核磁共振。參見例如*Epitope Mapping Protocols*, 見上文。蛋白質之抗原區亦可使用標準抗原性及親水性圖，諸如使用例如獲自Oxford Molecular Group之Omega 1.0版軟體程式計算的圖來鑑別。為測定抗原性型態，此電腦程式採用Hopp/Woods方法，Hopp等人, (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3824-3828；且對於親水性圖，採用Kyte-Doolittle技術，Kyte等人, (1982) *J. Mol. Biol.* 157:105-132。

### 經工程改造及修飾之抗體

本發明之抗體另外可使用具有一或多個VH及/或VL序列之抗體作為起始材料以對經修飾之抗體進行工程改造來製備，該經修飾之抗體可相對

於起始抗體具有改變之特性。抗體可藉由修飾一個或兩個可變區(亦即VH及/或VL)內，例如一或多個CDR區內及/或一或多個構架區內之一或多個殘基來進行工程改造。另外或替代地，抗體可藉由修飾恆定區內之殘基來進行工程改造，以例如改變抗體之效應功能。

可進行之一種類型的可變區工程改造為CDR移植。抗體主要經由位於六個重鏈及輕鏈互補決定區(CDR)之胺基酸殘基與靶抗原相互作用。出於此原因，在個別抗體之間，CDR內之胺基酸序列與CDR外之序列相比更加多樣化。由於CDR序列負責大部分抗體-抗原相互作用，故可藉由構築表現載體來表現模擬天然存在之特定抗體之特性的重組抗體，該等表現載體包括移植於具有不同特性之不同抗體的構架序列上的來自天然存在之特定抗體的CDR序列(參見例如Riechmann, L.等人, 1998 Nature 332:323-327 ; Jones, P.等人, 1986 Nature 321:522-525 ; Queen, C.等人, 1989 Proc. Natl. Acad., U.S.A. 86:10029-10033 ; Winter之美國專利第5,225,539號及Queen等人之美國專利第5,530,101號、第5,585,089號、第5,693,762號及第6,180,370號)。

此類構架序列可自包括生殖系抗體基因序列或重排抗體序列之公共DNA資料庫或公開參考文獻獲得。舉例而言，人類重鏈及輕鏈可變區基因之生殖系DNA序列可見於「VBase」人類生殖系序列資料庫(可在網際網路上在[www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)獲得)以及Kabat, E. A.等人, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH公開號91-3242 ; Tomlinson, I. M.等人, 1992 J. Mol. Biol. 227:776-798 ; 及Cox, J. P. L.等人, 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836 ; 其中之每一者的內容以引用的方式明確地併入本文

中。舉例而言，人類重鏈及輕鏈可變區基因之生殖系DNA序列及重排抗體序列可見於「IMGT」資料庫(可在網際網路上在www.imgt.org獲得；參見Lefranc, M.P.等人, 1999 *Nucleic Acids Res.* 27:209-212；其中之每一者的內容以引用的方式明確地併入本文中)。

適用於本發明之抗體及其抗原結合片段之構架序列的實例為結構上類似於供所選之本發明之抗體及其抗原結合片段使用之構架序列(例如供本發明之單株抗體使用之共同序列及/或構架序列)的構架序列。VH CDR1、2及3序列及VL CDR1、2及3序列可移植於構架區上，該等構架區具有與獲得構架序列之生殖系免疫球蛋白基因中所發現之序列一致的序列，或CDR序列可移植於與生殖系序列相比含有一或多個突變之構架區上。舉例而言，已發現，在某些情況下，使構架區內之殘基突變有益於維持或增強抗體之抗原結合能力(參見例如Queen等人之美國專利第5,530,101號；第5,585,089號；第5,693,762號及第6,180,370號)。

另一類型之可變區修飾為使VH及/或VL CDR1、CDR2及/或CDR3區內之胺基酸殘基突變，以藉此改良所關注之抗體之一或多種結合特性(例如親和力)，稱為「親和力成熟」。可進行定點誘變或PCR介導之誘變以引入突變及對抗體結合之影響，或可在如本文所述及實例中所提供之活體外或活體內分析中評估所關注之其他功能特性。可引入保守修飾(如上文所論述)。突變可為胺基酸取代、添加或缺失。此外，通常，在CDR區內不超過一個、兩個、三個、四個或五個殘基改變。

可採用廣泛多種抗體/免疫球蛋白構架或骨架，只要所得多肽包括至少一個特異性結合於TSLP之結合區即可。此類構架或骨架包括5種主要個體基因型之人類免疫球蛋白、其抗原結合片段，且包括其他動物物種之免疫

球蛋白，其較佳具有人類化態樣。單重鏈抗體(諸如在駱駝中鑑別之抗體)在此方面備受關注。熟習此項技術者不斷地發現及開發新穎的構架、骨架及片段。

在一個態樣中，本發明係關於一種使用上面可移植本發明之CDR之非免疫球蛋白骨架產生基於非免疫球蛋白之抗體的方法。可採用已知或未來非免疫球蛋白構架及骨架，只要其包含特異性針對目標TSLP蛋白質之結合區即可。已知非免疫球蛋白構架或骨架包括(但不限於)纖維結合蛋白(Compound Therapeutics, Inc., Waltham, Mass.)、錨蛋白(Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland)、域抗體(Domantis, Ltd., Cambridge, UK及Ablynx nv, Zwijnaarde, Belgium)、脂質運載蛋白(Pieris Proteolab AG, Freising, Germany)、小模組免疫藥物(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, Wash.)、最大抗體(Avidia, Inc., Mountain View, Calif.)、蛋白質A(Affibody AG, Sweden)及阿菲林(affilin) ( $\gamma$ -晶狀體球蛋白或泛素) (SciI Proteins GmbH, Halle, Germany)。

纖維結合蛋白骨架係基於III型纖維結合蛋白域(例如III型纖維結合蛋白之第十模組(10 Fn3域))。III型纖維結合蛋白域具有分佈在兩個 $\beta$ 摺疊之間的7或8個 $\beta$ 股，其自身抵靠著彼此填塞以形成蛋白質之核心，且另外含有使 $\beta$ 股彼此連接且暴露於溶劑之環(類似於CDR)。在 $\beta$ 摺疊夾層之各邊緣處存在至少三個此類環，其中邊緣為垂直於 $\beta$ 股方向之蛋白質邊界(參見美國專利第6,818,418號)。此等基於纖維結合蛋白之骨架並非免疫球蛋白，但總體摺疊與包含駱駝及駱馬IgG之完整抗原識別單元之最小功能抗體片段(重鏈可變區)的摺疊緊密相關。由於此結構，故非免疫球蛋白抗體模擬在性質及親和力上與抗體之抗原結合特性類似的抗原結合特性。此等骨架可

用於類似於活體內抗體之親和力成熟過程的活體外環隨機化及改組策略中。此等基於纖維結合蛋白之分子可用作骨架，其中分子之環區可使用標準選殖技術而經本發明之CDR置換。

錨蛋白技術係基於使用具有錨蛋白源重複模組作為攜有可用於結合於不同目標之可變區之骨架的蛋白質。錨蛋白重複模組為由兩個反向平行 $\alpha$ -螺旋及 $\beta$ -轉角組成之33個胺基酸多肽。可變區之結合主要藉由使用核糖體呈現來最佳化。

高親和性多聚體來源於含有天然A域之蛋白質，諸如LRP-1。此等域本質上用於蛋白質-蛋白質相互作用，且在人類中逾250種蛋白質在結構上基於A域。高親和性多聚體由經由胺基酸連接子連接之多個不同「A域」單體(2-10個)組成。可結合於目標抗原之高親和性多聚體可使用例如美國專利申請公開案第20040175756號；第20050053973號；第20050048512號；及第20060008844號中所述之方法產生。

親和抗體親和配位體為由三螺旋束構成之簡單小蛋白質，該三螺旋束基於蛋白質A之IgG結合域中之一者的骨架。蛋白質A為來自細菌金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的表面蛋白質。此架構域由58個胺基酸組成，其中13個隨機化以產生具有大量配位體變異體之親和抗體文庫(參見例如美國專利第5,831,012號)。親和抗體分子模擬抗體，與分子量為150 kDa之抗體相比，其分子量為6 kDa。儘管尺寸小，但親和抗體分子之結合位點與抗體之結合位點類似。

抗運載蛋白(Anticalin)為由公司Pieris ProteoLab AG開發之產品。其來源於脂質運載蛋白(一組廣泛的小型穩定蛋白質，其通常涉及化學敏感或不溶化合物之生理轉運或儲存)。數種天然脂質運載蛋白存在於人類組織或

體液中。蛋白質架構使人聯想到免疫球蛋白，其中高變環位於剛性構架之頂部。然而，與抗體或其重組片段相比，脂質運載蛋白由具有160至180個胺基酸殘基之單一多肽鏈構成，該多肽鏈僅略大於單一免疫球蛋白域。一組構成結合袋之四個環顯示明顯的結構可塑性且包容多個側鏈。結合位點因此可以專有方法再成形以利用高親和性及特異性識別不同形狀之指定目標分子。脂質運載蛋白家族之一種蛋白質，亦即大菜粉蝶(*Pieris Brassicae*)之後膽色素結合蛋白(BBP)，已用於藉由誘變處理一組四個環而開發抗運載蛋白。描述抗運載蛋白之專利申請案的一個實例存在於PCT公開案第WO 199916873號中。

阿菲林分子為小型非免疫球蛋白蛋白質，其經設計以對蛋白質及小分子具有特異性親和力。新阿菲林分子可極快速地選自兩個文庫，各文庫均基於不同的人類源架構蛋白。阿菲林分子對免疫球蛋白蛋白質不顯示任何結構同源性。目前使用兩種阿菲林骨架，其中之一者為 $\gamma$ 結晶體(人類結構性眼晶狀體蛋白質)，且另一者為「泛素」超家族蛋白質。兩種人類骨架均極小，顯示高溫穩定性且對pH值變化及變性劑幾乎具有抗性。此高穩定性主要歸因於蛋白質之 $\beta$ 摺疊結構擴大。 $\gamma$ 結晶體源蛋白質之實例描述於WO200104144中且「泛素樣」蛋白質之實例描述於WO2004106368中。

蛋白質抗原決定基模擬物(PEM)為模擬蛋白質之 $\beta$ 髮夾二級結構(涉及蛋白質-蛋白質相互作用的主要二級結構)的中型、環狀、肽樣分子(MW 1-2kDa)。

人類TSLP結合抗體可使用此項技術中已知的方法產生。舉例而言，人類工程改造技術用於將非人類抗體轉變成經工程改造之人類抗體。美國專利公開案第20050008625號描述一種用人類可變區置換抗體中之非人類

抗體可變區同時相對於非人類抗體維持相同或提供較佳結合特徵的活體內方法。該方法依賴於抗原決定基引導之用全人類抗體對非人類參考抗體之可變區的置換。所得人類抗體一般在結構上與參考非人類抗體不相關，但與參考抗體結合於相同抗原上之相同抗原決定基。簡言之，連續抗原決定基引導之互補置換方法藉由在對測試抗體與抗原之結合起反應的報導體系統存在下，在細胞中建立「競爭者」與參考抗體之多樣雜交文庫(「測試抗體」)之間結合於有限量之抗原的競爭來實現。競爭者可為參考抗體或其衍生物，諸如單鏈Fv片段。競爭者亦可為抗原之天然或人工配位體，其與參考抗體結合於相同抗原決定基。競爭者之唯一要求為其與參考抗體結合於相同抗原決定基，且其與參考抗體競爭結合抗原。測試抗體具有一個來自非人類參考抗體之共同抗原結合V區，且另一V區自諸如人類抗體譜系文庫之不同來源隨機選擇。來自參考抗體之共同V區充當嚮導，將測試抗體定位於抗原上之相同抗原決定基上，且呈相同取向，使得選擇偏向與參考抗體之最高抗原結合保真度。

許多類型的報導體系統可用於偵測測試抗體與抗原之間的所需相互作用。舉例而言，補充報導體片段可分別連接於抗原及測試抗體，使得僅僅當測試抗體結合於抗原時發生藉由片段互補之報導體活化。當測試抗體-報導體片段融合物及抗原-報導體片段融合物與競爭者共表現時，報導體活化變得視測試抗體與競爭者競爭之能力而定，該能力與測試抗體對抗原之親和力成比例。可使用之其他報導體系統包括如美國專利申請案序列號10/208,730 (公開案第20030198971號)中所揭示之自體抑制報導體再活化系統(RAIR)的再活化子，或美國專利申請案序列號10/076,845 (公開案第20030157579號)中所揭示之競爭活化系統。



使用連續抗原決定基引導之互補置換系統，進行選擇以鑑別表現單一測試抗體以及競爭者、抗原及報導體組分之細胞。在此等細胞中，各測試抗體與競爭者一對一競爭結合於有限量之抗原。報導體之活性與結合於測試抗體之抗原之量成比例，該量又與測試抗體對抗原之親和力及測試抗體之穩定性成比例。測試抗體最初基於當表現為測試抗體時其相對於參考抗體之活性選擇。第一輪選擇之結果為一組「雜交」抗體，各由來自參考抗體之相同非人類V區及來自文庫之人類V區構成，且各與參考抗體結合於抗原上相同抗原決定基。第一輪中選擇之更多雜交抗體之一對抗原之親和力將與參考抗體相當或高於其。

在第二V區置換步驟中，在第一步驟中選擇之人類V區用作嚮導，用於選擇同源人類V區之不同文庫對剩餘非人類參考抗體V區的人類置換。第一輪中選擇之雜交抗體亦可用作第二輪選擇之競爭者。第二輪選擇之結果為一組全人類抗體，其結構上不同於參考抗體，但與參考抗體競爭結合於相同抗原。一些所選人類抗體與參考抗體結合於相同抗原上之相同抗原決定基。在此等所選人類抗體中，一或多個以與參考抗體相當或高於其之親和力結合於相同抗原決定基。

### 駱駝科抗體

自駱駝及單峰駝(雙峰駱駝(*Camelus bactrianus*)及單峰駱駝(*Camelus dromaderius*))家族成員(包括新世界成員，諸如駱馬物種(羊駝(*Lama pacos*)、大羊駝(*Lama glama*)及瘦駝(*Lama vicugna*)))獲得之抗體蛋白已在尺寸、結構複雜性及對人類個體之抗原性方面加以表徵。如自然界中所發現之來自此哺乳動物家族之某些IgG抗體缺少輕鏈，且因此在結構上不同於其他動物抗體之具有兩條重鏈及兩條輕鏈之典型四鏈四級結構。參見

PCT/EP93/02214 (1994年3月3日公開之WO 94/04678)。

作為鑑別為VHH之小型單可變域的駱駝科抗體區可藉由基因工程改造獲得，以產生對目標具有高親和力之小蛋白質，產生稱作「駱駝科奈米抗體」之衍生自抗體之低分子量蛋白質。參見1998年6月2日頒佈之美國專利第5,759,808號；亦參見Stijlemans, B.等人, 2004 *J Biol Chem* 279: 1256-1261；Dumoulin, M.等人, 2003 *Nature* 424: 783-788；Pleschberger, M.等人 2003 *Bioconjugate Chem* 14: 440-448；Cortez-Retamozo, V.等人 2002 *Int J Cancer* 89: 456-62；及Lauwereys, M.等人 1998 *EMBO J* 17: 3512-3520。經工程改造之駱駝科抗體及抗體片段之文庫可購自例如Ablynx, Ghent, Belgium。如同非人類來源之其他抗體及其抗原結合片段，駱駝科抗體之胺基酸序列可以重組方式改變，以獲得更緊密類似人類序列之序列，亦即奈米抗體可「人類化」。由此，可進一步減小駱駝科抗體對人類之天然低抗原性。

駱駝科奈米抗體之分子量為人類IgG分子之約十分之一，且蛋白質之實體直徑僅為幾奈米。小尺寸之一種結果為駱駝科奈米抗體結合能夠結合於較大抗體蛋白質在功能上不可見的抗原位點，亦即，駱駝科奈米抗體適用作偵測抗原之試劑(否則使用經典免疫技術，抗原會隱匿)，及可能之治療劑。因此，小尺寸之又一結果為駱駝科奈米抗體由於結合於目標蛋白之凹槽或窄隙中之特定位點而可具抑制作用，且因此相較於經典抗體之功能，可以更緊密類似於經典低分子量藥物之功能的能力來發揮作用。

低分子量及緊湊尺寸進一步使駱駝科奈米抗體具極端熱穩定性、對極端pH值及蛋白水解消化具穩定性及不良抗原性。另一結果為駱駝科奈米抗體容易自循環系統移至組織中，且甚至跨過血腦障壁且可治療影響神經組

織之病症。奈米抗體可進一步促進藥物跨過血腦屏障輸送。參見2004年8月19日公開之美國專利申請案20040161738。此等特徵與對人類之低抗原性組合指示巨大治療潛力。另外，此等分子可在諸如大腸桿菌之原核細胞中完全表現，且用噬菌體表現為融合蛋白且具功能性。

因此，本發明之特徵為對TSLP具有高親和力之駱駝科抗體或奈米抗體。在本文中之一個實施例中，駱駝科抗體或奈米抗體在駱駝科動物中天然產生，亦即，使用本文關於其他抗體描述之技術由駱駝科在用TSLP或其肽片段進行免疫接種後產生。或者，TSLP結合駱駝科奈米抗體經工程改造，亦即藉由如本文實例中所述，使用淘選程序以TSLP作為目標自例如呈現適當誘變之駱駝科奈米抗體蛋白質中噬菌體文庫選擇來產生。經工程改造之奈米抗體可進一步藉由遺傳工程改造定製以使其在接受者個體中之半衰期為45分鐘至2週。在一特定實施例中，駱駝科抗體或奈米抗體係藉由將本發明之人類抗體之重鏈或輕鏈之CDR序列移植至奈米抗體或單域抗體構架序列中來獲得，如例如PCT/EP93/02214中所述。

### 雙特異性分子及多價抗體

在另一態樣中，本發明之特徵在於包含本發明之TSLP結合抗體或其片段之雙特異性或多特異性分子。本發明之抗體或其抗原結合片段可經衍生化或連接於另一功能分子，例如另一肽或蛋白質(例如另一抗體或受體之配位體)，以產生結合於至少兩個不同結合位點或目標分子之雙特異性分子。本發明之抗體可實際上經衍生化或連接於超過一種其他功能分子，以產生結合於超過兩個不同結合位點及/或目標分子之多特異性分子；此類多特異性分子亦意欲由如本文所用之術語「雙特異性分子」涵蓋。為產生本發明之雙特異性分子，本發明之抗體可在功能上與一或多個其他結合分子

(諸如另一抗體、抗體片段、肽或結合模擬劑)連接(例如藉由化學偶合、基因融合、非共價締合或以其他方式連接)，從而產生雙特異性分子。

因此，本發明包括包含至少一種針對TSLP之第一結合特異性及針對第二目標抗原決定基之第二結合特異性的雙特異性分子。舉例而言，第二目標抗原決定基可為不同於第一目標抗原決定基之另一TSLP抗原決定基。在其他實施例中，第二目標抗原決定基可為與TSLP不相關之目標，但其與TSLP組合提供治療效益。

另外，就本發明中雙特異性分子具多特異性而言，除第一及第二目標抗原決定基之外，分子可進一步包括第三結合特異性。

在一個實施例中，本發明之雙特異性分子包含至少一種抗體或其抗體片段(包括例如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv)作為結合特異性。抗體亦可為輕鏈或重鏈二聚體或其任何最小片段，諸如Fv或單鏈構築體，如Ladner等人之美國專利第4,946,778號中所述。

雙功能抗體為二價雙特異性分子，其中VH及VL域在單一多肽鏈上表現，其由過短而不容許同一鏈上之兩個域之間配對的連接子連接。VH及VL域與另一鏈之互補域配對，由此產生兩個抗原結合位點(參見例如Holliger等人, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448；Poijak等人, 1994 Structure 2:1121-1123)。雙功能抗體可藉由在同一細胞內表現具有結構VHA-VLB及VHB-VLA (VH-VL組態)或VLA-VHB及VLB-VHA (VL-VH組態)之兩個多肽鏈來產生。其中大多數可在細菌中以可溶形式表現。單鏈雙功能抗體(scDb)藉由用大致15個胺基酸殘基之連接子連接兩條形成雙功能抗體之多肽鏈來產生(參見Holliger及Winter, 1997 Cancer Immunol. Immunother., 45 (3-4):128-30；Wu等人, 1996 Immunotechnology, 2

(1):21-36)。scDb可在細菌中以可溶的活性單體形式表現(參見Holliger及Winter, 1997 *Cancer Immunol. Immunother.*, 45 (34): 128-30 ; Wu等人, 1996 *Immunotechnology*, 2 (1):21-36 ; Pluckthun及Pack, 1997 *Immunotechnology*, 3 (2): 83-105 ; Ridgway等人, 1996 *Protein Eng.*, 9 (7):617-21)。雙功能抗體可與Fc融合以產生「二-雙功能抗體」(參見Lu等人, 2004 *J. Biol. Chem.*, 279 (4):2856-65)。

可用於本發明之雙特異性分子中之其他抗體為鼠類、嵌合及人類化單株抗體。

本發明之雙特異性分子可藉由使用此項技術中已知之方法將組成性結合特異性結合來製備。舉例而言，雙特異性分子之各結合特異性可分別產生，且接著彼此結合。當結合特異性為蛋白質或肽時，可使用多種偶合劑或交聯劑進行共價結合。交聯劑之實例包括蛋白質A、碳化二亞胺、N-丁二醯亞胺基-5-乙醯基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫基雙(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、鄰伸苯基二順丁烯二醯亞胺(oPDM)、N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)及4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸磺基丁二醯亞胺基酯(磺基-SMCC) (參見例如Karpovsky等人, 1984 *J. Exp. Med.* 160:1686 ; Liu, M A等人, 1985 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648)。其他方法包括Paulus, 1985 *Behring Ins. Mitt.* 第78期, 118-132 ; Brennan等人, 1985 *Science* 229:81-83)及Glennie等人, 1987 *J. Immunol.* 139: 2367-2375)中所述之方法。結合劑為SATA及磺基-SMCC，兩者均購自Pierce Chemical Co. (Rockford, Ill.)。

當結合特異性為抗體時，其可藉由兩條重鏈之C端鉸鏈區之硫氫基鏈結來結合。在一特定實施例中，在結合之前，鉸鏈區經修飾以含有奇數個

硫氫基殘基，例如一個。

或者，兩種結合特異性可在同一載體中編碼，且在同一宿主細胞中表現及組裝。此方法特別適用於雙特異性分子為mAb×mAb、mAb×Fab、Fab×F(ab')<sub>2</sub>或配位體×Fab融合蛋白之情況中。本發明之雙特異性分子可為包含一個單鏈抗體及一個結合決定子之單鏈分子，或包含兩個結合決定子之單鏈雙特異性分子。雙特異性分子可包含至少兩個單鏈分子。用於製備雙特異性分子之方法描述於例如美國專利第5,260,203號；美國專利第5,455,030號；美國專利第4,881,175號；美國專利第5,132,405號；美國專利第5,091,513號；美國專利第5,476,786號；美國專利第5,013,653號；美國專利第5,258,498號；及美國專利第5,482,858號中。

雙特異性分子與其特異性目標之結合可藉由例如酶聯結免疫吸附劑分析(ELISA)、放射免疫分析(REA)、FACS分析、生物分析(例如生長抑制)或西方墨點分析來確認。此等分析中之每一者一般藉由採用特異性針對所關注之複合物之經標記試劑(例如抗體)偵測尤其受關注之蛋白質-抗體複合物的存在。

在另一態樣中，本發明提供包含至少兩個本發明之抗體及其抗原結合片段結合於TSLP之相同或不同抗原結合部分的多價化合物。抗原結合部分可經由蛋白質融合或共價或非共價鍵連接在一起。或者，已描述雙特異性分子之鍵聯方法。四價化合物可例如藉由使本發明之抗體及其抗原結合片段與結合於本發明之抗體及其抗原結合片段之恆定區(例如Fc或鉸鏈區)的抗體或抗原結合片段交聯來獲得。

三聚域描述於例如Borean Pharma之專利EP 1 012 280B1中。五聚模組描述於例如PCT/EP97/05897中。

## 半衰期延長之抗體

本發明提供特異性結合於TSLP且活體內半衰期延長之抗體。

許多因素可影響蛋白質的活體內半衰期。舉例而言，腎過濾、肝臟中之代謝、蛋白水解酶(蛋白酶)降解及免疫原性反應(例如藉由抗體中和蛋白質及由巨噬細胞及樹突細胞吸收)。多種策略可用於延長本發明之抗體及其抗原結合片段之半衰期。舉例而言，藉由與聚乙二醇(PEG)、reCODE PEG、抗體架構、聚唾液酸(PSA)、羥乙基澱粉(HES)、結合白蛋白之配位體及碳水化合物遮蔽物化學鍵聯；藉由與結合於血清蛋白質(諸如白蛋白、IgG、FcRn)之蛋白質遺傳融合且轉移；藉由與結合於血清蛋白質之其他結合部分(諸如奈米抗體、Fab、DARPin、高親和性多聚體、親和抗體及抗運輸蛋白)偶合(遺傳方式或化學方式)；藉由與rPEG、白蛋白、白蛋白域、白蛋白結合蛋白及Fc遺傳融合；或藉由併入奈米載體、緩釋調配物或醫學裝置中。

為了延長活體內抗體之血清循環，諸如高分子量PEG之惰性聚合物分子可經由PEG與抗體之N端或C端之位點特異性結合或經由存在於離胺酸殘基上之 $\epsilon$ 胺基、使用或不使用多官能性連接子連接於抗體或其片段。為使抗體聚乙二醇化，通常使抗體或其抗原結合片段與聚乙二醇(PEG) (諸如PEG之反應性酯或醛衍生物)在使一或多個PEG基團附接於抗體或抗體片段的條件下反應。聚乙二醇化可藉由與反應性PEG分子(或類似反應性水溶聚合物)之醯化反應或烷基化反應來進行。如本文所用，術語「聚乙二醇」意欲涵蓋已用於衍生其他蛋白質之任一種PEG形式，諸如單(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-順丁烯二醯亞胺。在一個實施例中，待聚乙二醇化之抗體為去糖基化抗體。將使用使生物活性損失降至最低之直鏈或分支鏈聚合物衍生化。結合度可藉由SDS-PAGE及質譜密切監測以確

保PEG分子與抗體之適當結合。未反應之PEG可藉由尺寸排阻或藉由離子交換層析而與抗體-PEG結合物分離。可使用熟習此項技術者熟知的方法(例如本文所述之免疫分析)測試PEG衍生化抗體的結合活性以及活體內功效。用於蛋白質聚乙二醇化之方法為此項技術中已知且可應用於本發明之抗體及其抗原結合片段。參見例如Nishimura等人之EP 0 154 316及Ishikawa等人之EP 0 401 384。

其他經修改之聚乙二醇化技術包括再建化學正交導引工程改造技術(ReCODE PEG)，其經由包括tRNA合成酶及tRNA之再建系統將化學上特定的側鏈併入生物合成蛋白質中。此技術實現將超過30個新胺基酸併入大腸桿菌、酵母及哺乳動物細胞中之生物合成蛋白質中。tRNA將規範胺基酸併入安置有琥珀密碼子之任何位置，將琥珀自終止密碼子轉換成信號傳導化學指定胺基酸之併入的密碼子。

重組聚乙二醇化技術(rPEG)亦可用於延長血清半衰期。此技術包括以遺傳方式將300至600個胺基酸非結構化蛋白質尾與現有醫藥蛋白質融合。由於此類非結構化蛋白質鏈之表觀分子量比其實際分子量大約15倍，因此蛋白質之血清半衰期大大延長。與需要化學結合及再純化之傳統聚乙二醇化相比，此製造方法大大簡化且產物為均質的。

另一技術為聚唾液酸化，其使用天然聚合物聚唾液酸(PSA)延長有效壽命且改良治療性肽及蛋白質之穩定性。PSA為唾液酸聚合物(一種糖)。當用於遞送蛋白質及治療性肽藥物時，聚唾液酸為結合提供保護性微環境。此提高治療性蛋白質在循環中之有效壽命且防止其被免疫系統識別。PSA聚合物天然發現於人體中。進化逾數百萬年之某些細菌採用PSA聚合物覆蓋其壁。此等天然聚唾液酸化細菌接著能夠藉助於分子擬態來阻擋人



體防禦系統。此類細菌中可容易產生大量且具有預定物理特徵之PSA(天然之終極隱匿技術)。由於細菌PSA與人體中之PSA在化學上相同，因此細菌PSA完全不具免疫原性，即使與蛋白質偶合。

另一技術包括使用連接於抗體之羥乙基澱粉(「HES」)衍生物。HES為來源於蠟質玉米澱粉之經修飾之天然聚合物，且可藉由人體酶代謝。通常投與HES溶液以取代血容量不足及改良血液之流變特性。抗體之羥乙基澱粉化能夠藉由提高分子穩定性以及藉由減小腎清除率而延長循環半衰期，從而提高生物活性。藉由改變不同參數，諸如HES分子量，可定製廣泛範圍之HES抗體結合物。

亦可藉由將一或多個胺基酸修飾(亦即取代、插入或缺失)引入IgG恆定域或其FcRn結合片段(較佳Fc或鉸鏈Fc域片段)中來產生活體內半衰期延長之抗體。參見例如國際公開案第WO 98/23289號；國際公開案第WO 97/34631號；及美國專利第6,277,375號。

此外，抗體可結合於白蛋白，以製備在活體內更穩定或具有更長活體內半衰期的抗體或抗體片段。該等技術在此項技術中熟知，參見例如國際公開案第WO 93/15199號、第WO 93/15200號及第WO 01/77137號，及歐洲專利第EP 413,622號。

延長半衰期之策略尤其適用於奈米抗體、基於纖維結合蛋白之結合劑及需要延長活體內半衰期之其他抗體或蛋白質。

### 抗體結合物

本發明提供特異性結合於TSLP之細胞外域的抗體或其抗原結合片段與異源蛋白質或多肽(或其抗原結合片段，較佳與至少10個、至少20個、至少30個、至少40個、至少50個、至少60個、至少70個、至少80個、至少90

個或至少100個胺基酸之多肽)重組融合或化學結合(包括共價及非共價結合)而產生融合蛋白。特別地，本發明提供包含本文所述抗體之抗原結合片段(例如Fab片段、Fd片段、Fv片段、F(ab)<sub>2</sub>片段、VH域、VH CDR、VL域或VL CDR)及異源蛋白質、多肽或肽之融合蛋白。使蛋白質、多肽或肽與抗體或抗體片段融合或結合之方法在此項技術中已知。參見例如美國專利第5,336,603號、第5,622,929號、第5,359,046號、第5,349,053號、第5,447,851號及第5,112,946號；歐洲專利EP 307,434號及EP 367,166號；國際公開案WO 96/04388號及WO 91/06570號；Ashkenazi等人, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539；Zheng等人, 1995, J. Immunol. 154:5590-5600；及Vil等人, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341。

其他融合蛋白可經由基因混排(shuffling)、基元混排、外顯子混排及/或密碼子混排(統稱為「DNA混排」)之技術產生。可使用DNA混排以改變本發明之抗體及其抗原結合片段(例如具有較高親和力及較低解離速率之抗體及其抗原結合片段)的活性。一般參見美國專利第5,605,793號、第5,811,238號、第5,830,721號、第5,834,252號及第5,837,458號；Patten等人, 1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33；Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16 (2):76-82；Hansson等人, 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76；及Lorenzo及Blasco, 1998, Biotechniques 24 (2):308-313 (此等專利及公開案各自以全文引用的方式併入本文中)。抗體及其抗原結合片段或經編碼之抗體及其抗原結合片段可藉由在重組前利用易錯PCR、隨機核苷酸插入或其他方法進行隨機誘變而改變。編碼特異性結合於TSLP之柄區的抗體其抗原結合片段的聚核苷酸可與一或多個異源分子之一或多個組分、基元、區

段、部分、域、片段等重組。

此外，抗體及其抗原結合片段可與標記序列(諸如肽)融合以促進純化。在一個實施例中，標記胺基酸序列為六組胺酸肽(SEQ ID NO: 40)，其中諸如pQE載體(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311)中提供之標籤，其中許多可購得。如Gentz等人, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824中所述，例如提供六組胺酸(SEQ ID NO: 40)以便於純化融合蛋白。適用於純化之其他肽標籤包括(但不限於)血球凝集素(「HA」)標籤，其對應於來源於流感血球凝集素蛋白之抗原決定基(Wilson等人, 1984, Cell 37:767)，及「FLAG」標籤。

在一個實施例中，本發明之抗體及其抗原結合片段、其抗原結合片段結合於診斷或可偵測劑。此類抗體可適用於監測或預後疾病或病症之發作、發展、進展及/或嚴重程度作為臨床測試程序之一部分，諸如測定特定療法之功效。此類診斷及偵測可藉由使抗體與可偵測物質偶合來實現，該等可偵測物質包括(但不限於)各種酶，諸如(但不限於)辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶或乙醯膽鹼酯酶；輔基，諸如(但不限於)抗生蛋白鏈菌素/生物素及抗生物素蛋白/生物素；螢光物質，諸如(但不限於)傘酮、螢光素、異硫氰酸螢光素、若丹明(rhodamine)、二氯三嗪基胺螢光素、丹磺醯氯或藻紅素；發光物質，諸如(但不限於)魯米諾(luminol)；生物發光物質，諸如(但不限於)螢光素酶、螢光素及水母素；放射性物質，諸如(但不限於)碘( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 及 $^{121}\text{I}$ )、碳( $^{14}\text{C}$ )、硫( $^{35}\text{S}$ )、氫( $^3\text{H}$ )、銦( $^{115}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 及 $^{111}\text{In}$ )、鎝( $^{99}\text{Tc}$ )、鈦( $^{201}\text{Ti}$ )、鎳( $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ )、鈀( $^{103}\text{Pd}$ )、鉬( $^{99}\text{Mo}$ )、氙( $^{133}\text{Xe}$ )、氟( $^{18}\text{F}$ )、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{68}\text{Ge}$ 、

57Co、65Zn、85Sr、32P、153Gd、169Yb、51Cr、54Mn、75Se、113Sn及117Tin；及使用各種正電子發射斷層攝影之正電子發射金屬，及非放射性順磁金屬離子。

另外，抗體其抗原結合片段可結合於治療部分或藥物部分。治療部分或藥物部分不應解釋為限於經典化學治療劑。舉例而言，藥物部分可為具有所需生物活性之蛋白質、肽或多肽。此類蛋白質可包括例如毒素，諸如相思子毒素、蓖麻毒素A、綠膿桿菌外毒素、霍亂毒素或白喉毒素；蛋白質，諸如腫瘤壞死因子、 $\alpha$ 干擾素、 $\beta$ 干擾素、神經生長因子、血小板衍生長因子、組織纖維蛋白溶酶原活化因子；細胞凋亡劑；抗血管生成劑；或生物反應調節劑，諸如淋巴激素。

此外，抗體可結合於治療部分，諸如放射性金屬離子，諸如 $\alpha$ -發射體，諸如213Bi；或適用於使放射金屬離子(包括(但不限於) 131In、131Lu、131Y、131Ho、131Sm)與多肽結合之巨環螯合劑。在一個實施例中，巨環螯合劑為1,4,7,10-四氮雜環十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA)，其可經由連接子分子附接於抗體。此類連接子分子通常為此項技術中已知的且描述於Denardo等人，1998, Clin Cancer Res. 4 (10):2483-90；Peterson等人，1999, Bioconjug. Chem. 10 (4):553-7；及Zimmerman等人，1999, Nucl. Med. Biol. 26 (8):943-50中，其各以全文引用的方式併入。

使治療部分與抗體結合之技術為吾人所熟知，參見例如Amon等人，「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」，於Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy中，Reisfeld等人(編)，第243-56頁(Alan R. Liss, Inc. 1985)；Hellstrom等人，「Antibodies For Drug Delivery」，於Controlled Drug Delivery (第2版)中，Robinson等

人 (編), 第623-53頁 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」, 於 Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications中, Pinchera等人 (編), 第475-506頁 (1985); 「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」, 於 Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy 中, Baldwin等人 (編), 第303-16頁 (Academic Press 1985)及Thorpe等人, 1982, Immunol. Rev. 62:119-58。

抗體亦可附接於固體支撐物, 其特別適用於目標抗原之免疫分析或純化。此類固體支撐物包括(但不限於)玻璃、纖維素、聚丙烯醯胺、耐綸 (nylon)、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

#### 編碼抗體之核酸

本發明提供實質上經純化之核酸分子, 其編碼包含上文所述之TSLP抗體之區段或域的多肽。此類聚核苷酸可編碼來自本文所述之TSLP抗體之重鏈或輕鏈的至少一個CDR區且通常全部三個CDR區。此類聚核苷酸亦可編碼本文所述之TSLP抗體之重鏈及/或輕鏈的全部或實質上全部可變區序列。此類聚核苷酸亦可編碼抗體之可變區及恆定區。因為密碼簡併, 所以多種核酸序列將編碼免疫球蛋白胺基酸序列中之每一者。

聚核苷酸序列可藉由重新固相DNA合成或藉由編碼TSLP結合抗體或其結合片段之現有序列(例如如以下實例中所述之序列)之PCR誘變來產生。核酸之直接化學合成可藉由此項技術中已知之方法實現, 諸如Narang等人, 1979, Meth. Enzymol. 68:90之磷酸三酯法; Brown等人, Meth. Enzymol. 68:109, 1979之磷酸二酯法; Beaucage等人, Tetra. Lett.,

22:1859, 1981之胺基磷酸二乙酯法；及美國專利第4,458,066號之固體支撐物法。藉由PCR向聚核苷酸序列引入突變可如以下文獻中所述進行：例如 PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. A. Erlich (編), Freeman Press, NY, NY, 1992；PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis等人(編), Academic Press, San Diego, Calif., 1990；Mattila等人, Nucleic Acids Res. 19:967, 1991；及Eckert等人, PCR Methods and Applications 1:17, 1991。

本發明亦提供產生上文所述之TSLP結合抗體之表現載體及宿主細胞。各種表現載體可用於表現編碼TSLP結合抗體鏈或結合片段之聚核苷酸。基於病毒之表現載體與非病毒表現載體均可用於在哺乳動物宿主細胞中產生抗體。非病毒載體及系統包括質體、游離型載體(通常具有用於表現蛋白質或RNA之表現卡匣)及人類人工染色體(參見例如Harrington等人, Nat Genet. 15:345, 1997)。舉例而言，適用於在哺乳動物(例如人類)細胞中表現TSLP結合聚核苷酸及多肽之非病毒載體包括pThioHis A、B及C、pcDNA3.1/His、pEBVHis A、B及C (Invitrogen, San Diego, Calif.)、MPSV載體及此項技術中已知用於表現其他蛋白質之許多其他載體。適用的病毒載體包括基於反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒之載體；基於SV40、乳頭狀瘤病毒、HBP埃-巴二氏病毒(HBP Epstein Barr virus)、牛痘病毒載體及勝利基森林病毒(Semliki Forest virus；SFV)之載體。參見Brent等人，見上文；Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995；及Rosenfeld等人, Cell 68:143, 1992。

表現載體之選擇視欲表現載體之預定宿主細胞而定。通常，表現載體含有可操作地連接於編碼TSLP結合抗體鏈抗原結合片段之聚核苷酸的啟

動子及其他調節序列(例如強化子)。在一個實施例中，誘導性啟動子用於在除誘導條件外的條件下防止插入序列表現。誘導性啟動子包括例如阿拉伯糖、lacZ、金屬硫蛋白啟動子或熱休克啟動子。經轉型之生物體培養物可在使群體不偏向表現產物被宿主細胞良好耐受之編碼序列的非誘導條件下擴增。除啟動子之外，其他調節元件亦可為TSLP結合抗體鏈或抗原結合片段之有效表現所必需或需要的。此等元件通常包括ATG起始密碼子及相鄰的核糖體結合位點或其他序列。另外，表現效率可藉由在使用中包涵對細胞系統合適之強化子來增強(參見例如Scharf等人, *Results Probl. Cell Differ.* 20:125, 1994；及Bittner等人, *Meth. Enzymol.*, 153:516, 1987)。舉例而言，SV40強化子或CMV強化子可用於提高哺乳動物宿主細胞中之表現。

表現載體亦可提供分泌信號序列位置以與由所插入之TSLP結合抗體序列編碼之多肽形成融合蛋白。更通常，所插入之TSLP結合抗體序列在包含於載體中之前連接於信號序列。待用於接受編碼TSLP結合抗體輕鏈及重鏈可變域之序列之載體有時亦編碼恆定區或其部分。此類載體允許可變區與恆定區表現為融合蛋白，從而產生完整抗體及其抗原結合片段。通常，此類恆定區為人類恆定區。

含有及表現TSLP結合抗體鏈之宿主細胞可為原核或真核細胞。大腸桿菌為一種適用於選殖及表現本發明聚核苷酸之原核宿主。適用之其他微生物宿主包括桿菌(諸如枯草桿菌(*Bacillus subtilis*))，及其他腸內菌科(諸如沙門氏菌屬(*Salmonella*)、沙雷氏菌屬(*Serratia*))，及多種假單胞菌屬。在此等原核宿主中，吾人亦可製造表現載體，其通常含有與宿主細胞相容之表現控制序列(例如複製起點)。另外，將存在任何數目之多種熟知啟動

子，諸如乳糖啟動子系統、色胺酸(trp)啟動子系統、 $\beta$ -內醯胺酶啟動子系統或來自噬菌體 $\lambda$ 之啟動子系統。啟動子通常視情況與操縱序列一起控制表現，且具有用於起始且完成轉錄及轉譯之核糖體結合位點序列及其類似序列。諸如酵母之其他微生物亦可用於表現本發明之TSLP結合多肽。亦可使用昆蟲細胞與桿狀病毒載體之組合。

在一個實施例中，哺乳動物宿主細胞用於表現及產生本發明之TSLP結合多肽。舉例而言，其可為表現內源性免疫球蛋白基因之融合瘤細胞株(例如，如實例中所述之1D6.C9骨髓瘤融合瘤純系)或具有外源性表現載體之哺乳動物細胞株(例如以下例示之SP2/0骨髓瘤細胞)。此等細胞包括任何正常死亡或正常或異常永生動物或人類細胞。舉例而言，已開發出能夠分泌完整免疫球蛋白之多種適合宿主細胞株，包括CHO細胞株、各種Cos細胞株、海拉細胞(HeLa cells)、骨髓瘤細胞株、經轉型之B細胞及融合瘤。使用哺乳動物組織細胞培養物表現多肽大體上論述於例如Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987中。哺乳動物宿主細胞之表現載體可包括表現控制序列，諸如複製起點、啟動子及強化子(參見例如Queen等人, Immunol. Rev. 89:49-68, 1986)，及必需的處理資訊位點(諸如核糖體結合位點、RNA剪接位點、聚腺苷酸化位點)，及轉錄終止子序列。此等表現載體通常含有來源於哺乳動物基因或來源於哺乳動物病毒之啟動子。適合之啟動子可為組成性、細胞類型特異性、階段特異性及/或可調節或可調控的。適用之啟動子包括(但不限於)金屬硫蛋白啟動子、組成性腺病毒主要晚期啟動子、地塞米松(dexamethasone)誘導性MMTV啟動子、SV40啟動子、MRP poIII啟動子、組成性MPSV啟動子、四環素(tetracycline)誘導性CMV啟動子(諸如人類即刻早期CMV啟動



子)、組成性CMV啟動子及此項技術中已知之啟動子-強化子組合。

引入含有所關注之聚核苷酸序列之表現載體的方法視細胞宿主之類型而變化。舉例而言，氯化鈣轉染通常用於原核細胞，而磷酸鈣處理或電穿孔可用於其他細胞宿主。(一般參見Sambrook等人，見上文)。其他方法包括例如電穿孔、磷酸鈣處理、脂質體介導之轉型、注射及顯微注射、衝擊法、病毒顆粒(virosome)、免疫脂質體、聚陽離子:核酸結合物、裸DNA、人工病毒粒子、與疱疹病毒結構蛋白VP22融合(Elliot及O'Hare, Cell 88:223, 1997)、DNA之藥劑增強性吸收，及離體轉導。為了長期高產率產生重組蛋白質，將常常需要穩定的表現。舉例而言，穩定表現TSLP結合抗體鏈或結合片段之細胞株可使用本發明之表現載體製備，其含有病毒複製起點或內源性表現元件及可選標記基因。在引入載體之後，可使細胞在交換至選擇性培養基之前，於豐富培養基中生長1-2天。可選標記之目的為賦予抗性以便選擇，且其存在允許成功表現所引入序列的細胞在選擇性培養基中生長。經穩定轉染之抗性細胞可使用適於該細胞類型之組織培養技術增殖。

### 抗體及抗體片段之產生

單株抗體(mAb)可藉由多種技術產生，包括習知單株抗體方法，例如Kohler及Milstein, 1975 Nature 256: 495之標準體細胞雜交技術。產生單株抗體之許多技術可採用例如B淋巴細胞之病毒或致癌轉型。

用於製備融合瘤之動物系統為鼠類系統。小鼠中之融合瘤產生為沿用已久之程序。分離經免疫之脾細胞用於融合之免疫方案及技術為此項技術中已知。融合搭配物(例如鼠類骨髓瘤細胞)及融合程序亦為已知。

在一些實施例中，本發明之抗體為人類化單株抗體。本發明之嵌合或

人類化抗體及其抗原結合片段可基於如上所述製備之鼠類單株抗體之序列製備。編碼重鏈及輕鏈免疫球蛋白之DNA可自所關注之鼠類融合瘤獲得且使用標準分子生物學技術進行工程改造以含有非鼠類(例如人類)免疫球蛋白序列。舉例而言，為產生嵌合抗體，可使用此項技術中已知之方法使鼠類可變區連接於人類恆定區(參見例如Cabilly等人之美國專利第4,816,567號)。為產生人類化抗體，可使用此項技術中已知之方法將鼠類CDR區插入人類構架中。參見例如Winter之美國專利第5,225,539號及Queen等人之美國專利第5,530,101號、第5,585,089號、第5,693,762號及第6180370號。

在一些實施例中，本發明之抗體為人類單株抗體。此類針對TSLP之人類單株抗體可使用攜帶部分人類免疫系統而非小鼠系統之轉殖基因或轉染色體小鼠來產生。此等轉殖基因及轉染色體小鼠包括在本文中分別稱為HuMAb小鼠及KM小鼠之小鼠且在本文中統稱為「人類Ig小鼠」。

HuMAb Mouse® (Medarex, Inc.)含有編碼未重排人類重鏈( $\mu$ 及 $\gamma$ )及 $\kappa$ 輕鏈免疫球蛋白序列之人類免疫球蛋白基因微型基因座以及使內源性 $\mu$ 及 $\kappa$ 鏈基因座不活化之靶向突變(參見例如Lonberg等人, 1994 Nature 368 (6474): 856-859)。因此，小鼠展現小鼠IgM或K表現減少，且回應於免疫，所引入之人類重鏈及輕鏈轉殖基因經歷類別轉換及體細胞突變以產生高親和力人類IgG- $\kappa$ 單株(Lonberg, N.等人, 1994見上文；綜述於Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101；Lonberg, N.及Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93；及Harding, F.及Lonberg, N., 1995 Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546中)。HuMAb小鼠之製備及用途及由此類小鼠攜帶之基因組修飾進一步描述於Taylor, L.等人, 1992 Nucleic Acids Research 20:6287-6295；Chen, J.等人, 1993

International Immunology 5: 647-656 ; Tuailleon等人, 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724 ; Choi等人, 1993 Nature Genetics 4:117-123 ; Chen, J.等人, 1993 EMBO J. 12: 821-830 ; Tuailleon等人, 1994 J. Immunol. 152:2912-2920 ; Taylor, L.等人, 1994 International Immunology 579-591 ; 及Fishwild, D.等人, 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851 , 以上所有之內容皆以全文引用之方式專門併入本文中。此外參見美國專利第5,545,806號、第5,569,825號、第5,625,126號、第5,633,425號、第5,789,650號、第5,877,397號、第5,661,016號、第5,814,318號、第5,874,299號及第5,770,429號(皆頒予Lonberg及Kay) ; 美國專利第5,545,807號(頒予Surani等人) ; PCT公開案第WO 92103918號、第WO 93/12227號、第WO 94/25585號、第WO 97113852號、第WO 98/24884號及第WO 99/45962號(皆頒予Lonberg及Kay) ; 及PCT公開案第WO 01/14424號(頒予Korman等人)。

在一些實施例中，人類抗體可使用在轉殖基因及轉染色體上攜帶人類免疫球蛋白序列之小鼠(諸如攜帶人類重鏈轉殖基因及人類輕鏈轉染色體之小鼠)來產生。此類小鼠(在本文中稱為「KM小鼠」)詳細描述於Ishida等人之PCT公開案WO 02/43478中。

再者，表現人類免疫球蛋白基因之替代轉殖基因動物系統在此項技術中可獲得，且可用於產生TSLP結合抗體及其抗原結合片段。舉例而言，可使用稱為Xenomouse (Abgenix, Inc.)之替代轉殖基因系統。此類小鼠描述於例如Kucherlapati等人之美國專利第5,939,598號、第6,075,181號、第6,114,598號、第6,150,584號及第6,162,963號。

另外，表現人類免疫球蛋白基因之替代轉染色體動物系統可在此項技

術中獲得，且可用於產生本發明之TSLP結合抗體。舉例而言，可使用稱為「TC小鼠」之攜帶人類重鏈轉染色體及人類輕鏈轉染色體之小鼠；此類小鼠描述於Tomizuka等人, 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727中。此外，攜帶人類重鏈及輕鏈轉染色體之牛已描述於此項技術中(Kuroiwa等人, 2002 Nature Biotechnology 20:889-894)，且可用於產生本發明之TSLP結合抗體。

人類單株抗體亦可使用篩選人類免疫球蛋白基因文庫之噬菌體呈現方法來製備。分離人類抗體之此類噬菌體呈現方法在此項技術中已確立或描述於下文實例中。參見例如：Ladner等人之美國專利第5,223,409號、第5,403,484號及第5,571,698號；Dower等人之美國專利第5,427,908號及第5,580,717號；McCafferty等人之美國專利第5,969,108號及第6,172,197號；及Griffiths等人之美國專利第5,885,793號、第6,521,404號、第6,544,731號、第6,555,313號、第6,582,915號及第6,593,081號。

本發明之人類抗體亦可使用人類免疫細胞已重建於其中以使得免疫接種時可產生人類抗體反應之SCID小鼠來製備。此類小鼠描述於例如Wilson等人之美國專利第5,476,996號及第5,698,767號中。

抗體Fab片段或Fab可藉由用番木瓜蛋白酶消化單株抗體且隨後藉由親和層析純化來產生。Fab亦可藉由如上所述使用編碼Fab之核酸以重組方式合成產生。Fab片段可保留完全IgG分子之結合特異性及/或活性，但具有較小尺寸且具有較低分子量，使其可適用於與完全IgG分子不同的應用。

#### 構架或Fc工程改造

本發明之經工程改造之抗體及其抗原結合片段包括其中已對VH及/或VL內之構架殘基進行修飾，例如以改善抗體特性之抗體及其抗原結合片

段。通常進行此類構架修飾以降低抗體之免疫原性。舉例而言，一種方法為使一或多個構架殘基「回復突變」成相應生殖系序列。更特定言之，已經歷體細胞突變之抗體可含有不同於抗體所來源之生殖系序列的構架殘基。此類殘基可藉由比較抗體構架序列與抗體所來源之生殖系序列來鑑別。為使構架區序列返回其生殖系組態，體細胞突變可藉由例如定點誘變「回復突變」成生殖系序列。本發明亦意欲涵蓋此類「回復突變」抗體。

構架修飾之另一類型包括使構架區內或甚至一或多個CDR區內之一或多個殘基突變，以移除T細胞抗原決定基，藉此降低抗體之潛在免疫原性。此方法亦稱為「去免疫」，且進一步詳細描述於Carr等人之美國專利公開案第20030153043號中。

除構架或CDR區內所作之修飾之外或可替代地，本發明之抗體可經工程改造以包括Fc區內之修飾，通常以改變抗體之一或多種功能特性，諸如血清半衰期、補體結合、Fc受體結合及/或抗原依賴性細胞毒性。此外，本發明之抗體可經化學修飾(例如可將一或多個化學部分附接於抗體上)或經修飾以改變其糖基化，從而再改變抗體之一或多種功能特性。此等實施例各進一步詳細描述於下文中。Fc區中之殘基編號為Kabat EU索引編號。

在一個實施例中，CH1之鉸鏈區經修飾以使得鉸鏈區中半胱胺酸殘基之數目改變，例如增加或減少。此方法進一步描述於Bodmer等人之美國專利第5,677,425號中。CH1鉸鏈區中之半胱胺酸殘基數經改變以例如促進輕鏈及重鏈之組裝或提高或降低抗體之穩定性。

在另一實施例中，抗體之Fc鉸鏈區經突變以縮短抗體之生物半衰期。更特定言之，將一或多個胺基酸突變引入Fc鉸鏈片段之CH2-CH3域介面區中，使得抗體對葡萄球菌蛋白質A (SpA)的結合相對於原生Fc鉸鏈域SpA

結合減弱。此方法進一步詳細描述於Ward等人之美國專利第6,165,745號中。

在另一實施例中，抗體經修飾以延長其生物半衰期。可進行多種方法。舉例而言，可引入以下突變中之一或多者：T252L、T254S、T256F，如Ward之美國專利第6,277,375號中所述。或者，為延長生物半衰期，抗體可在CH1或CL區內改變以含有獲自IgG之Fc區之CH2域的兩個環的救助受體結合抗原決定基，如Presta等人之美國專利第5,869,046號及第6,121,022號中所述。

在一個實施例中，Fc區藉由用不同胺基酸殘基置換至少一個胺基酸殘基來改變，以改變抗體之效應功能。舉例而言，一或多個胺基酸可經不同胺基酸殘基置換以使得抗體具有改變之針對效應子配位體的親和力、但保留親本抗體之抗原結合能力。親和力改變之效應子配位體可為例如Fc受體或補體之C1組分。此方法進一步詳細描述於例如Winter等人之美國專利第5,624,821號及第5,648,260號中。

在另一實施例中，選自胺基酸殘基之一或多個胺基酸可經不同胺基酸殘基置換，以使得抗體具有改變之C1q結合及/或降低或消除之補體依賴性細胞毒性(CDC)。此方法進一步詳細描述於Idusogie等人之美國專利第6,194,551號中。

在另一實施例中，一或多個胺基酸殘基經改變以藉此改變抗體固定補體之能力。此方法進一步描述於Bodmer等人之PCT公開案WO 94/29351中。

在另一實施例中，Fc區藉由修飾一或多個胺基酸而經修飾以提高抗體介導抗體依賴性細胞毒性(ADCC)之能力及/或提高抗體對Fc $\gamma$ 受體之親和

力。此方法進一步描述於Presta之PCT公開案WO 00/42072中。此外，已定位人類IgG1對Fcγ RI、Fcγ RII、Fcγ RIII及FcRn之結合位點且已描述結合改良之變異體(參見Shields, R. L.等人, 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604)。

在另一實施例中，抗體之糖基化經修飾。舉例而言，可產生去糖基化抗體(亦即，缺乏糖基化之抗體)。糖基化可經改變以例如提高抗體對抗原之親和力。此類碳水化合物修飾可藉由例如改變抗體序列內之一或多個糖基化位點來實現。舉例而言，可進行一或多個胺基酸取代，以消除一或多個可變區構架糖基化位點，藉此消除該位點之糖基化。此類去糖基化可提高抗體對抗原之親和力。此類方法進一步詳細描述於Co等人之美國專利第5,714,350號及第6,350,861號中。

另外或替代地，可產生糖基化類型改變之抗體，諸如海藻糖基殘基量減少之低海藻糖基化抗體或二分GlcNac結構增加之抗體。此類經改變之糖基化模式已證明會提高抗體之ADCC能力。此類碳水化合物修飾可藉由例如在糖基化機制改變之宿主細胞中表現抗體來實現。糖基化機制改變之細胞已描述於此項技術中且可用作表現本發明之重組抗體以藉此產生糖基化改變之抗體的宿主細胞。舉例而言，Hang等人之EP 1,176,195描述一種細胞株，其中編碼海藻糖基轉移酶之FUT8基因在功能上破壞，使得此類細胞株中所表現之抗體展現低海藻糖基化。Presta之PCT公開案WO 03/035835描述一種變異CHO細胞株LecI3細胞，其降低使海藻糖附接於Asn (297)連接之碳水化合物的能力，亦使得該宿主細胞中所表現之抗體低海藻糖基化(亦參見Shields, R. L.等人, 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740)。Umana等人之PCT公開案WO 99/54342描述經工程改造以表現糖蛋白修飾型糖基

轉移酶(例如 $\beta(1,4)$ --N乙醯基葡萄糖胺轉移酶III (GnTIII))的細胞株，使得經工程改造之細胞株內所表現之抗體展現增加之二分GlcNac結構，從而提高抗體之ADCC活性(亦參見Umana等人, 1999 Nat. Biotech. 17:176-180)。

#### 工程改造經改變之抗體的方法

如上文所論述，本文中展示之具有VH及VL序列或全長重鏈或輕鏈序列之TSLP結合抗體可用於藉由修飾全長重鏈及/或輕鏈序列、VH及/或VL序列或附接於其之恆定區來產生新TSLP結合抗體。因此，在本發明之另一態樣中，本發明之TSLP結合抗體的結構特徵用於形成結構上相關之TSLP結合抗體，其保留本發明之抗體及其抗原結合片段的至少一種功能特性，諸如結合於人類TSLP。

舉例而言，如上文所論述，本發明之抗體及其抗原結合片段的一或多個CDR區或其突變可以重組方式與已知之構架區及/或其他CDR組合，以產生其他經重組工程改造之本發明之TSLP結合抗體及其抗原結合片段。其他修飾類型包括先前部分中所述之修飾。用於工程改造方法之起始物質為本文所提供之VH及/或VL序列中之一或多者，或其一或多個CDR區。為產生經工程改造之抗體，不必實際上製備(亦即以蛋白質形式表現)具有本文所提供之VH及/或VL序列中之一或多者或其一或多個CDR區的抗體。確切而言，序列中所含之資訊用作起始物質以產生來源於原始序列之「第二代」序列，且隨後製備「第二代」序列且表現為蛋白質。

經改變之抗體序列亦可藉由篩選具有固定CDR3序列或如US2005025552中所述之最少必需結合決定子及CDR1與CDR2序列之多樣性的抗體文庫來製備。篩選可根據適於自抗體文庫篩選抗體之任何篩選技術(諸如噬菌體呈現技術)進行。



可使用標準分子生物學技術製備及表現經改變之抗體序列。由經改變之抗體序列編碼之抗體為保留本文所述之TSLP結合抗體之一個、一些或全部功能特性的抗體，該等功能特性包括(但不限於)特異性結合於人類TSLP蛋白質且使其穩定。

經改變之抗體之功能特性可使用此項技術中可獲得及/或本文所述之標準分析(諸如闡述於實例中之分析(例如ELISA))評定。

在一些實施例中，工程改造本發明之抗體及其抗原結合片段的方法，可沿著TSLP結合抗體編碼序列的全部或部分隨機或選擇性引入突變且可針對結合活性及/或如本文所述之其他功能特性篩選所得經修飾之TSLP結合抗體。突變方法已描述於此項技術中。舉例而言，Short之PCT公開案WO 02/092780描述使用飽和誘變、合成接合組裝或其組合來產生及篩選抗體突變之方法。或者，Lazar等人之PCT公開案WO 03/074679描述使用電腦篩選方法使抗體之生理化學特性最佳化的方法。

### 本發明之抗體之表徵

本發明之抗體及其抗原結合片段可藉由多種功能分析來表徵。舉例而言，其可藉由其結合TSLP及抑制TSLP活性之能力來表徵。

抗體結合於TSLP之能力可藉由直接標記所關注之抗體來偵測，或抗體可未標記且使用此項技術中已知之各種夾心分析格式間接偵測結合。

在一些實施例中，本發明之TSLP結合抗體及其抗原結合片段阻斷參考TSLP結合抗體與TSLP多肽之結合或與其競爭。此等抗體可為上文所述之全人類或人類化TSLP結合抗體。其亦可為與參考抗體結合於相同抗原決定基之其他人類、小鼠、嵌合或人類化TSLP結合抗體。阻斷參考抗體結合或與參考抗體競爭結合之能力表明測試之TSLP結合抗體結合於與參考抗

體所界定之抗原決定基相同或類似之抗原決定基，或結合於足夠靠近參考TSLP結合抗體所結合之抗原決定基的抗原決定基。此類抗體尤其可共享針對參考抗體所鑑別之有利特性。阻斷參考抗體或與參考抗體競爭之能力可藉由例如競爭結合分析測定。使用競爭結合分析，檢驗測試抗體抑制參考抗體與諸如TSLP多肽之共同抗原特異性結合之能力。若過量測試抗體實質上抑制參考抗體結合，則測試抗體與參考抗體競爭特異性結合於抗原。實質上抑制意謂測試抗體降低參考抗體之特異性結合通常達至少10%、25%、50%、75%或90%。

存在多種已知競爭結合分析可用以評定抗體與參考抗體競爭結合於特定蛋白質(在此情況下，TSLP)。此等分析包括例如固相直接或間接放射免疫分析(RIA)、固相直接或間接酶免疫分析(EIA)、夾心競爭分析(參見Stahli等人, *Methods in Enzymology* 9:242-253, 1983)；固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA (參見Kirkland等人, *J. Immunol.* 137:3614-3619, 1986)；固相直接標記分析、固相直接標記夾心分析(參見Harlow及Lane, 見上文)；使用I-125標記之固相直接標記RIA (參見Morel等人, *Molec. Immunol.* 25:7-15, 1988)；固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA (Cheung等人, *Virology* 176:546-552, 1990)；以及直接標記RIA (Moldenhauer等人, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82, 1990)。通常，此類分析涉及使用結合於攜有未經標記之測試TSLP結合抗體及經標記之參考抗體中任一者的固體表面或細胞之經純化抗原。競爭性抑制係藉由在測試抗體存在下測定結合於固體表面或細胞之標記的量來量測。通常測試抗體過量存在。藉由競爭分析(競爭抗體)鑑別之抗體包括與參考抗體結合於相同抗原決定基之抗體及結合於足夠靠近參考抗體所結合之抗原決定基之相鄰抗原決定基以發生位

阻的抗體。

為確定所選TSLP結合單株抗體是否結合於獨特抗原決定基，可使用市售試劑(例如來自Pierce, Rockford, Ill之試劑)對各抗體進行生物素標記。使用未標記之單株抗體及經生物素標記之單株抗體的競爭研究可使用TSLP多肽塗佈之ELISA盤進行。經生物素標記之MAb結合可用鏈黴素-抗生物素蛋白-鹼性磷酸酶探針偵測。為確定經純化之TSLP結合抗體的同型，可進行同型ELISA。舉例而言，在4°C下可將微量滴定盤之孔塗佈以1 µg/ml抗人類IgG隔夜。在用1% BSA阻斷之後，盤與1 µg/ml或小於1 µg/ml之單株TSLP結合抗體或經純化之同型對照在環境溫度下反應一至兩小時。接著可使孔與人類IgG1或人類IgM特異性鹼性磷酸酶結合之探針反應。接著使盤顯影且分析，從而可確定經純化之抗體的同型。

為證實單株TSLP結合抗體與表現TSLP多肽之活細胞的結合，可使用流動式細胞量測術。簡言之，表現TSLP之細胞株(在標準生長條件下生長)可與各種濃度之TSLP結合抗體在含有0.1% BSA及10%胎牛血清之PBS中混合，且在37°C下培育1小時。在洗滌之後，使細胞與螢光素標記之抗人類IgG抗體在與初級抗體染色相同之條件下反應。樣品可藉由FACSscan儀器，使用光及側散射特性對單細胞進行閘控來分析。除流動式細胞量測術分析之外或代替流動式細胞量測術分析，可使用螢光顯微法之替代性分析。細胞可如上所述準確染色且藉由螢光顯微法檢驗。此方法允許目測個別細胞，但可具有降低之靈敏度，視抗原密度而定。

本發明之TSLP結合抗體及其抗原結合片段可藉由西方墨點法進一步測試與TSLP多肽或抗原片段之反應性。簡言之，可製備經純化之TSLP多肽或融合蛋白或來自表現TSLP之細胞之細胞提取物且進行十二烷基硫酸

鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳。在電泳之後，經分離之抗原轉移至硝化纖維素膜，用10%胎牛血清阻斷，且用待測試之單株抗體探測。可使用抗人類IgG鹼性磷酸酶偵測人類IgG結合且用BCIP/NBT受質錠劑(Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.)顯影。

功能分析之實例亦描述以下實例部分中。

### **醫藥組合物及調配物**

本文亦提供組合物，例如醫藥組合物，其包含一或多種特異性結合TSLP之分子(例如抗體、抗體片段，諸如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、微型抗體或雙功能抗體)作為活性成分。

醫藥組合物通常包括醫藥學上可接受之賦形劑。醫藥學上可接受之賦形劑可包括與醫藥投與相容之生理食鹽水、溶劑、分散介質、包衣、抗細菌及抗真菌劑、等張及吸收延緩劑及其類似物。醫藥組合物通常調配成與其預定投藥途徑相容。舉例而言，對於藉由吸入投與，化合物可以氣溶膠噴霧形式自含有適合推進劑(例如氣體，諸如二氧化碳)之加壓容器或分配器或噴霧器遞送。此類方法包括美國專利第6,468,798號中所述之方法。

在一些實施例中，本文所提供之醫藥組合物經調配以靶向遞送至個體之呼吸道，尤其個體之肺。此類調配物可避免活性成分沈積於個體之上呼吸道中，由此使與藥物沈積於口腔及咽喉相關聯之耐受性或安全性問題減至最少。在一些實施例中，本文所提供之醫藥組合物調配為乾燥粉末調配物。此類乾燥粉末調配物可包括活性成分、殼形成賦形劑、玻璃形成賦形劑及緩衝劑。

### **活性成分**

乾燥粉末調配物之活性成分可包括如本文所述之抗TSLP抗體及抗體

片段中之一或多者。

可調節醫藥調配物中活性成分之量以便每一單位劑量遞送治療有效量之活性成分，從而達成所需結果。實際上，此將視特定成分、其活性、待治療之病狀的嚴重程度、患者群體、給藥要求、所需治療作用及組合物中所含之添加劑的相對量而大幅改變。組合物將一般含有約1重量%至約99重量%的活性成分，例如約5重量%至約95重量%、約10重量%至約90重量%、約15重量%至85重量%、約20重量%至80重量%、約25重量%至75重量%、約30重量%至70重量%、約40重量%至60重量%或約50重量%之活性成分。本發明之組合物特別適用於以0.001毫克/天至100毫克/天之劑量，較佳以0.01毫克/天至75毫克/天之劑量且更佳以0.10毫克/天至50毫克/天之劑量遞送活性成分。應理解，大於一種活性成分可併入本文所述之調配物中，且使用術語「活性成分」決不排除使用兩種或大於兩種此類活性成分。

### 賦形劑

在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物含有醫藥學上可接受之疏水性殼形成賦形劑。殼形成賦形劑為增強噴霧乾燥粉末之分散性的表面活性劑。疏水性殼形成賦形劑可採用多種形式，其將至少在一定程度上取決於組合物及乾燥粉末調配物之既定用途。適合的醫藥學上可接受之疏水性賦形劑可一般選自由長鏈磷脂、疏水性胺基酸及肽及長鏈脂肪酸皂組成之群。

在一些實施例中，殼形成賦形劑包括：甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、三白胺酸、二白胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸、二棕櫚醯基磷脂醯膽鹼(DPPC)、二硬脂醯基磷脂醯膽鹼(DSPC)及硬脂酸鎂。在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物包括三白胺酸。

藉由控制調配物及方法，噴霧乾燥粒子之表面可主要由殼形成賦形劑構成。表面濃度可大於70%，諸如大於75%或80%或85%。在一些實施例中，表面由大於90%殼形成賦形劑、或大於95%或98%或99%疏水性賦形劑構成。對於有效活性成分，表面由大於95%殼形成賦形劑構成並非不常見的。

在一些實施例中，殼形成賦形劑如藉由化學分析用電子能譜術(ESCA，亦稱為X射線光電子光譜或XPS)所量測，包含大於70%粒子介面，較佳大於90%或95%。

在一些實施例中，殼形成賦形劑有助於皺粒子形態的出現。此意謂粒子形態為多孔、起皺、波紋或有折痕而非光滑的。此意謂可吸入藥劑粒子之內表面及/或外表面至少部分為皺的。此皺度藉由改良粉末流體化及分散性而適用於提供高遞送效率、劑量一致性及藥物靶向。粒子皺度增加導致粒子間內聚力降低，因為粒子不能接近於凡得瓦爾接觸內。內聚力降低足以顯著改良皺粒子系集中之粉末流體化及分散性。

若存在，則殼形成賦形劑之含量一般介於約15至50% w/w藥劑範圍內。對於三白胺酸，調配物中最少需要約15%以提供作為殼形成劑可接受之效能。對於白胺酸，最小所需含量較高，約30%。

諸如三白胺酸之疏水性殼形成賦形劑的使用可受其在液體原料中之溶解度限制。通常，經工程改造之粉末中的三白胺酸含量小於30% w/w，更常常為約10% w/w至20% w/w (約10-30% w/w)。由於其有限的水溶性及其表面活性，故三白胺酸為極好的殼形成劑。白胺酸亦可用作殼形成賦形劑且本發明之實施例可包含白胺酸濃度為約50%至75%的粒子。

脂肪酸皂行為類似於白胺酸及三白胺酸且因此為適合的表面調節劑。

由於乾燥事件之時間標度短，故溶解於原料中之活性成分將一般以非晶形固體形式存在於噴霧乾燥藥品中。

非晶形固體之分子運動性在與其結晶對應體相比時為顯著的。分子運動性包含與分子擴散相關之長程運動以及諸如鍵旋轉之局部運動。非晶形材料之固態穩定的中心原理為分子運動性產生不合需要的物理及化學變化。因此，非晶形材料之調配策略通常集中於抑制分子運動性。

分子運動性與不穩定性之間存在關係為直觀且眾所周知的。然而，為了使用，分子運動性必須依據所存在之運動類型加以謹慎定義及理解。長程分子運動由稱為 $\alpha$ -弛豫之結構弛豫引起。此類運動之時間標度隨著溫度降低至低於玻璃轉移溫度(Tg)，或相反地，在固定觀測溫度下隨著Tg升高而明顯增加。由於玻璃中分子之穩定限制其長程分子運動性，故此已變成最常見的非晶形藥物之固態穩定調配策略。

固態分子運動性之玻璃態穩定控制(諸如經由使用玻璃形成劑)可改良調配物中蛋白質之物理化學穩定性。當需要玻璃形成劑時，多個考慮因素將支配其選擇。玻璃形成賦形劑之主要作用為減少藥物之總體長程分子運動性。實際上，此藉由升高含有藥物之非晶相的玻璃轉移溫度來實現。雖然具有高Tg值之賦形劑一般為所需的，但即使具有中等Tg之賦形劑仍可能適用於一些調配物(例如，具有中等Tg之藥物或若調配物中之藥物濃度低)。為了指導調配者，值得強調理想玻璃形成劑之特性：具有高玻璃轉移溫度之生物相容性材料，其可與藥物混溶，從而形成僅由水微弱塑化之單一非晶相。

在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物含有玻璃形成賦形劑。抑制長程分子運動性之玻璃形成賦形劑包括碳水化合物、胺基酸及緩衝

劑。在一些實施例中，玻璃形成賦形劑包括：組胺酸、組胺酸HCl、蔗糖、海藻糖、甘露醇及檸檬酸鈉。因此，一些賦形劑(諸如組胺酸)可互換地稱為緩衝劑或玻璃形成賦形劑。在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物(例如核殼調配物)包括海藻糖。

其他類型之分子運動的重要性已在醫藥文獻中變得愈來愈受認可。用於標明分子運動類型之命名法( $\alpha$ 、 $\beta$ 等)起源於寬頻介電譜。介電弛豫譜習知在頻率標度上標繪。當解譯此等譜時，在最低頻率下之介電耗損峰稱為 $\alpha$ 運動，較高頻率運動稱為 $\beta$ 運動，接著 $\gamma$ ，以此類推。因此， $\beta$ 及在較高頻率下存在之其他運動稱為「快速」或二級運動(且在一些情況下，喬哈里-戈德斯坦弛豫(Johari-Goldstein relaxation))。雖然此等二級弛豫常常歸屬於不同分子部分(例如蛋白質上之側鏈)的分子內運動，但即使剛性分子仍存在此等二級弛豫。在極簡物理圖像中， $\beta$ 運動有時描述為截留在最近相鄰者當中之物質的無規「籠型顫動」。在一些點處，最近相鄰者之局部運動提供足以使得截留物質擴散跳躍的自由體積。此為 $\alpha$ 運動。因此， $\beta$ 運動引起 $\alpha$ 運動。

二級運動為出於理論及實際觀點之活躍研究領域。並且，雖然大量文獻涉及凍乾或熔融-淬滅玻璃，但原理亦與經工程改造以用於吸入之非晶形粒子(例如使用噴霧乾燥或某些其他由下而上方法製造之粉末)有關。接近 $T_g$ 之小分子結晶已疑似由 $\beta$ 運動引起。蛋白質調配者已認識到控制此等 $\beta$ 運動之重要性。通常，使用少量有機賦形劑(諸如甘油、甘露醇、山梨醇及二甲亞砷)進行非晶形調配物中 $\beta$ 運動之抑制。雖然此等賦形劑為最常報導的抑制 $\beta$ 運動的賦形劑，但其他低MW有機分子亦可提供此目的(例如緩衝鹽或相對離子)。假設此等賦形劑藉由升高局部黏度而抑制高運動性域之運



動。對於熟悉關於玻璃態穩定之大量文獻的讀者，使用此類賦形劑似乎違反直覺。此等及大部分其他低分子量材料具有低T<sub>g</sub>值且將減小調配物之T<sub>g</sub>，其為一種稱為塑化之現象。然而，此等賦形劑亦可削弱β運動。因此，其稱為反塑化劑或有時稱為塑化劑，視參考點而定；雖然其使α運動塑化，但其使β運動反塑化。注意，此術語為文獻中可能的混淆來源；材料稱為塑化劑或反塑化劑視吾人之參考點是否為α或二級運動而定。

由於蛋白質之固態穩定需要調配玻璃態基質，故α及β運動之作用尤其受關注。雖然文獻已大量提及使用玻璃形成劑穩定蛋白質，但直至近來，仍極少專門提及此等試劑對局部運動之影響。雖然蛋白質之玻璃轉移溫度難以量測，但大部分資料表明T<sub>g</sub>>150°C。因此，最常用於穩定蛋白質之賦形劑(例如雙糖，諸如蔗糖或海藻糖)亦將使蛋白質中之α運動塑化(及使二級運動反塑化)。最新研究已證明β運動主要支配糖玻璃中蛋白質之穩定性。因此，雙糖使蛋白質調配物中之β運動反塑化。

在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物包含具有高玻璃轉移溫度(>80°C)之玻璃形成賦形劑。在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物包含玻璃形成劑，諸如蔗糖、海藻糖、甘露醇、反丁烯二醯基二酮哌嗪及檸檬酸鈉。

玻璃形成劑之混合物可用於達成非晶形固體之最佳穩定。對於『平台』核殼調配物，在一些實施例中使用海藻糖及甘露醇之混合物。

為達成抑制分子運動性及達成物理及化學穩定性所需之玻璃形成劑的量將視活性劑之性質而定。對於具有噴霧乾燥蛋白質之一些實施例，玻璃形成劑與蛋白質之莫耳比可在300至900範圍內。對於小分子，玻璃形成劑之所需量將視活性劑之T<sub>g</sub>而定。

在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物含有緩衝劑。緩衝劑已熟知用於控制pH，作為在生理學相容之pH下遞送藥物的手段(亦即以改良耐受性)以及提供有利於藥物之化學穩定性的溶液條件。在本文所述之一些調配物及方法中，藥物之pH環境可藉由將藥物及緩衝劑一起共調配於同一粒子中來控制。

雖然質疑固態藥品中pH之含義為自然的，但許多研究已證明pH控制對於固態化學穩定性的重要性。水為普遍存在的，即使在固態「乾燥」粉末調配物中。除了作為非晶形材料之塑化劑的作用以外，水為反應物、降解產物且亦可充當溶解及化學反應之介質。有跡象表明水吸附於粒子表面上可在表面膜內產生飽和溶液。實際上，一些研究已使用藥物漿液(亦即飽和溶液)之pH作為溶解於「乾燥」粉末之表面膜中之藥物的局部或「微環境」pH的指標。在一些情況下，已顯示微環境pH與藥物之穩定性有關。

如同藥物一般，賦形劑亦溶解於吸附水之表面膜中以形成飽和溶液。此可用於調配者能夠控制水分吸附層之局部pH的優勢。緩衝劑或pH調節劑(諸如組胺酸或磷酸鹽)常用於凍乾或噴霧乾燥調配物以控制蛋白質之溶液及固態化學降解。

在一些實施例中，用於調配物之緩衝劑包括：組胺酸、甘胺酸、乙酸鹽及磷酸鹽。

視情況選用之賦形劑包括鹽(例如氯化鈉、氯化鈣、檸檬酸鈉)、抗氧化劑(例如甲硫胺酸)、減少溶液中蛋白質聚集之賦形劑(例如精胺酸)、遮味劑及設計成改良大分子吸收於體循環中之試劑(例如反丁烯二醯基二酮哌嗪)。

## 調配物

本文提供乾燥粉末調配物，其包含有效避免沈積於普通成年個體之口咽的噴霧乾燥粒子，使得能夠靶向遞送藥劑至肺中。

在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物的粒子的活體外總肺劑量(TLD)在普通成年個體標稱劑量之80與95% w/w之間，例如在85與90% w/w之間。

在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物的粒子的活體外總肺劑量(TLD)在普通成年個體遞送劑量之90與100% w/w之間，例如在90與95% w/w之間。

在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物包含適當具有在120與400  $\mu\text{m}^2$  L/min之間，例如在150與300  $\mu\text{m}^2$  L/min之間的慣性參數的遞送劑量。

在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物包含經工程改造之包含多孔、波紋或皺表面的粒子。此類粒子與具有可比初始粒度之微米化藥物晶體相比展現減小的粒子間內聚力。此使得粉末流體化及分散性相對於微米化藥物與粗乳糖之有序混合物得以改良。

在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物的粒子的皺度大於1.5，例如1.5至20、3至15或5至10。

對於一些活性醫藥成分，例如許多肽或蛋白質(例如抗TSLP Fab)，可經由噴霧乾燥純藥物而獲得皺表面。在此情況下，調配物可包含純藥物，亦即100% w/w活性劑或藥物。

在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物包含藥物及緩衝劑。該調配物可包含70%至99% w/w藥物或活性劑，且剩餘部分為緩衝劑。

在一些實施例中，本文所述之調配物可包含0.1至99% w/w活性劑、

或0.1至70% w/w活性劑、或0.1至50% w/w活性成分、或0.1%至30% w/w性成分。

在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物可包括賦形劑以進一步增強調配物之穩定性或生物相容性。舉例而言，涵蓋多種鹽、緩衝劑、抗氧化劑、殼形成賦形劑及玻璃形成賦形劑。

在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物的粒子的幾何尺寸表示為質量中值直徑( $x_{50}$ )，其在0.8與2.0  $\mu\text{m}$ 之間，例如在1.0與1.5  $\mu\text{m}$ 之間。

在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物的粒子的幾何尺寸表示為 $x_{90}$ ，其在2.0  $\mu\text{m}$ 與4.0  $\mu\text{m}$ 之間，例如在2.5  $\mu\text{m}$ 與3.5  $\mu\text{m}$ 之間。

在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物的粒子的敲緊密度( $\rho_{\text{敲緊}}$ ) $\rho_{\text{敲緊}}$ )在0.03與0.40  $\text{g}/\text{cm}^3$ 之間，例如在0.07與0.30  $\text{g}/\text{cm}^3$ 之間。

在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物的初始粒子的計算所得的中值空氣動力學尺寸( $D_a$ ) $D_a$ )在0.1與1.0  $\mu\text{m}$ 之間，例如在0.5與0.8  $\mu\text{m}$ 之間。

在一些實施例中，本文所述之乾燥粉末調配物的粒子的計算所得的空氣動力學直徑在0.5與1.2  $\mu\text{m}$ 之間，例如在0.8與1.0  $\mu\text{m}$ 之間。

在一些實施例中，以遞送劑量存在之本文所述之乾燥粉末調配物的粒子系集的質量中值空氣動力學直徑(MMAD)適當地介於1.0與3.0  $\mu\text{m}$ 之間，例如在1.5與2.0  $\mu\text{m}$ 之間。

在一些實施例中，本發明之調配物含有包含殼及核心之粒子：三白胺酸作為殼形成劑存在於粒子表面，且核心包含活性成分(例如抗TSLP Fab)、海藻糖或海藻糖與甘露醇之組合及緩衝劑。

在一些實施例中，本發明提供一種調配物，其包含約40% (w/w) TSLP結合分子(例如抗TSLP Fab1)、約25% (w/w)三白胺酸、約30% (w/w)經組

合之海藻糖及甘露醇、及約5% (w/w)組胺酸。在其他實施例中，本申請案提供一種調配物，其包含約50% (w/w) TSLP結合分子、約15% (w/w)三白胺酸、約2.6% (w/w) HCl、約5.6% (w/w)組胺酸及約26.8% (w/w)經組合之海藻糖及鹼；或約50% (w/w) TSLP結合分子、約15% (w/w)三白胺酸、約19.4% (w/w)海藻糖、約13% (w/w)組胺酸及約2.6% (w/w) HCl。

在其他實施例中，本申請案揭示一種無載劑醫藥粉末組合物，其包含可由乾燥粉末吸入器遞送且包含本文所揭示之抗TSLP分子的粒子，其中活體外總肺劑量大於遞送劑量之90%，且其中遞送劑量中之粒子的慣性參數在120與400  $\mu\text{m}^2$  L/min之間。

在另一實施例中，本申請案揭示一種可由乾燥粉末吸入器遞送之無載劑醫藥組合物，該組合物包含複數個粒子，該等粒子包含具有如本文所揭示之抗TSLP分子及至少一種玻璃形成賦形劑的核心，及具有疏水性賦形劑及緩衝劑之殼；且其中活體外總肺劑量大於遞送劑量之90% w/w。在一些實施例中，粒子藉由噴霧乾燥形成。在另一實施例中，疏水性賦形劑包含三白胺酸。

在另一實施例中，本申請案揭示一種無載劑醫藥組合物，其包含可由乾燥粉末吸入器遞送之複數個初始粒子及粒子聚結物，該組合物包含如本文所揭示之抗TSLP分子，且其中活體外總肺劑量(TLD)大於標稱劑量之80%，且其中該等初始粒子之特徵在於：波紋形態；中值空氣動力學直徑(Da)在0.3與1.0  $\mu\text{m}$ 之間；且其中由乾燥粉末吸入器遞送之粒子及粒子聚結物的質量中值空氣動力學直徑(MMAD)在1.5與3.0  $\mu\text{m}$ 之間。在一些實施例中，醫藥組合物另外包含含有初始粒子之容器，該容器適於含有在乾燥粉末吸入器內氣溶膠化之前的粒子，且其中包含可呼吸聚結物之氣溶膠在該

氣溶膠化後形成。

在另一實施例中，本申請案揭示一種用於經肺遞送之醫藥粉末調配物，該粉末包含具有1至100重量%如本文所揭示之抗TSLP分子的粒子，其中該粉末之特徵在於至少50%之粒度分佈在1至1.5微米之間，粉末密度為0.05至0.3 g/cm<sup>3</sup>，空氣動力學直徑小於2微米，皺度為1.5至20；且其中該粉末藉由吸入投與，且提供大於80%之活體外總肺劑量。在一些實施例中，醫藥粉末調配物為無載劑的。在其他實施例中，粉末封裝在與乾燥粉末吸入器一起使用的容器中，且其中當使用該乾燥粉末吸入器氣溶膠化時，粉末藉由質量中值空氣動力學直徑小於約2微米之可呼吸聚結物表徵。

## 方法

本文亦提供用於製備包含噴霧乾燥粒子之用於吸入之乾燥粉末調配物的方法，該調配物含有至少一種活性成分，且活體外總肺劑量(TLD)在普通成年個體標稱劑量之80與95% w/w之間，例如在85與90% w/w之間。

本文亦提供用於製備包含噴霧乾燥粒子之用於吸入之乾燥粉末調配物的方法，該調配物含有至少一種活性成分，且活體外總肺劑量(TLD)在普通成年個體遞送劑量之90與100% w/w之間，例如在90與95% w/w之間。

在一些實施例中，乾燥粉末調配物含有至少一種適於治療阻塞性或發炎性呼吸道疾病(尤其哮喘及/或COPD)之活性成分，例如抗TSLP Fab。在一些實施例中，乾燥粉末調配物含有至少一種適於以體循環非侵入性治療疾病之活性成分。

噴霧乾燥在產生經工程改造用於吸入之粒子時賦予優勢，諸如快速產生乾燥粉末之能力及控制粒子屬性，包括尺寸、形態、密度及表面組成。乾燥方法非常快速(數量級為毫秒)。因此大部分溶解於液相中之活性成分

以非晶形固體形式沈澱，因為其不具有充足時間結晶。

噴霧乾燥包含四個單元操作：原料製備、原料霧化以產生微米大小之液滴、在熱氣體中乾燥液滴及用袋濾室或旋風分離器收集乾燥粒子。

在一些實施例中，製造乾燥粉末粒子之方法包含三個步驟，然而，在一些實施例中，可實質上同時進行此等步驟中之兩者或甚至全部三者，因此在實踐中，該方法可實際上視為單一步驟方法。僅僅出於描述本發明之目的，將分別描述三個步驟，但此類描述不意欲侷限於三步驟方法。

在一些實施例中，該方法包括製備溶液原料及噴霧乾燥該原料以提供活性乾燥粉末粒子。原料包含至少一種溶解於水基液體原料中之活性成分。在一些實施例中，原料包含至少一種溶解於包含所添加之共溶劑的水基原料中的活性成分(例如抗TSLP Fab1)。在一些實施例中，原料包含至少一種溶解於乙醇/水原料中之活性劑，其中乙醇分數在5%及30% w/w之間，例如在5%與20% w/w之間。

對於非晶形固體，重要的是控制藥品的水分含量。對於並非水合物之藥物，粉末之水分含量較佳小於5%、更通常小於3%或甚至2% w/w。然而，水分含量必須足夠高以確保粉末不展現顯著的靜電吸引力。噴霧乾燥粉末中之水分含量可藉由卡爾費歇爾滴定法(Karl Fischer titrimetry)測定。

在一些實施例中，將原料噴霧至溫熱的過濾空氣流中以蒸發溶劑且將乾燥產物傳送至收集器。已用空氣接著與溶劑一起排出。可調節噴霧乾燥器之操作條件，諸如入口及出口溫度、進料速率、霧化壓力、乾燥空氣之流動速率及噴嘴組態，以便產生所得乾燥粒子之所需粒度、水分含量及產品產率。適當設備及加工條件之選擇在熟習此項技術者鑒於本文中之教示的範圍內且可在無不當實驗的情況下實現。NIRO® PSD-1®規模乾燥器之示

例性設定如下：進氣口溫度在約80°C與約200°C之間，諸如在110°C與170°C之間；出氣口在約40°C至約120°C之間，諸如約60°C與100°C之間；液體進料速率在約30 g/min至約120 g/min之間，諸如約50 g/min至100 g/min；總空氣流量為約140標準立方呎/分(scfm)至約230 scfm，諸如約160 scfm至210 scfm；且霧化空氣流動速率在約30 scfm與約90 scfm之間，諸如約40 scfm至80 scfm。噴霧乾燥原料中之固體含量將通常在0.5% w/v (5 mg/ml)至10% w/v (100 mg/ml)範圍內，諸如1.0% w/v至5.0% w/v。設定將當然視所用設備之規模及類型以及所用溶劑系統之性質而變化。在任何情況下，使用此等及類似方法允許形成具有適合於氣溶膠沈積至肺中之直徑的粒子。

在一些實施例中，賦形劑全部溶解於原料中，且分散活性成分上之核殼包衣藉由經溶解溶質之物理特性的差異驅動。

如先前關於包含非晶形活性成分之粒子所論述，粒子表面之性質及形態將藉由控制原料內組分之溶解度及擴散率來控制。表面活性疏水性賦形劑(例如三白胺酸、磷脂、脂肪酸皂)可濃縮在介面處，從而改良粉末流體化及分散性，同時亦驅動粒子之表面粗糙度增加。

任何噴霧乾燥步驟及/或所有噴霧乾燥步驟可使用用於製備適用於藉由吸入投與之醫藥中之噴霧乾燥粒子的習知設備來進行。市售噴霧乾燥器包括由Büchi Ltd.及Niro Corp製造之噴霧乾燥器。

在一些實施例中，原料經雙流體噴嘴霧化。液滴之粒度分佈顯著變寬出現在高於約1.5% w/w之固體負載下。分佈尾部之液滴大小愈大導致相應粉末分佈中之粒子愈大。因此，使用雙流體噴嘴之一些實施例將固體負載限定於1.5% w/w或小於1.5% w/w，諸如1.0% w/w或0.75% w/w。

在一些實施例中，可使用如例如美國專利第7,967,221號及第



8,616,464號所揭示之平面膜霧化器在較高固體負載下達成窄液滴大小分佈。在一些實施例中，原料在2%至10% w/w (諸如3%至5% w/w)之固體負載下霧化。

在一些實施例中，粒子群體密度或PPD在 $0.01 \times 10^{-6}$ 與 $1.0 \times 10^{-6}$ 之間，諸如在 $0.03 \times 10^{-6}$ 與 $0.2 \times 10^{-6}$ 之間。

在一些實施例中，EtOH/固體比率在1.0與20.0之間，諸如在3.0與10.0之間。

在一些實施例中，本申請案揭示一種用於吸入之醫藥粉末調配物，其包含藉由包含以下步驟之方法製造的粒子：

a. 製備本文所揭示之抗TSLP結合分子於水/乙醇混合物中之溶液，其中存在1至20%之乙醇且乙醇與總固體之比率在1與20之間；

b. 噴霧乾燥該溶液以獲得微粒，其中該等微粒之特徵在於粒子密度為 $0.2 \text{ g/cm}^3$ 或低於 $0.2 \text{ g/cm}^3$ ，幾何直徑為1-3微米且空氣動力學直徑為1至2微米；

且其中該粉末在藉由吸入投與時，提供大於約80%之活體外總肺劑量。在一些實施例中，醫藥粉末調配物另外包括玻璃形成賦形劑。在一些實施例中，玻璃形成賦形劑包含 $\alpha$ 。在其他實施例中，玻璃形成賦形劑包含 $\beta$ 。在另一實施例中，玻璃形成賦形劑包含海藻糖。

在醫藥粉末調配物之一些實施例中，粒子群體密度在 $0.01 \times 10^{-6}$ 與 $1.0 \times 10^{-6}$ 之間。

本申請案亦揭示一種向個體之肺遞送包含乾燥粉末之粒子的方法，該方法包含：

a. 製備本文所揭示之抗TSLP結合分子於水/乙醇混合物中之溶液，其

中存在5至20%之乙醇，

b. 噴霧乾燥該溶液以獲得微粒，其中該等微粒之特徵在於粒子密度在約0.05與0.3 g/cm<sup>3</sup>之間，幾何直徑為1-3微米且空氣動力學直徑為1-2微米；

c. 將該噴霧乾燥粉末封裝於容器中；

d. 提供具有用於自容器提取粉末之構件的吸入器，該吸入器另外具有粉末流體化及氣溶膠化構件，該吸入器可經約2至約6 kPa之患者驅動的吸氣力操作；該吸入器及粉末一起提供在約120與400 μm<sup>2</sup> L/min之間的慣性參數且其中該粉末在藉由吸入投與時，提供至少90%肺沈積。

本申請案亦揭示一種製備用於經肺遞送之乾燥粉末藥劑調配物的方法，該方法包含

a. 製備本文所揭示之抗TSLP結合分子於水/乙醇混合物中之溶液，其中存在5至20%之乙醇，

b. 噴霧乾燥該溶液以獲得微粒，其中該等微粒之特徵在於粒子密度在約0.05與0.3之間，幾何直徑為1-3微米且空氣動力學直徑為1-2微米。

在另一實施例中，本申請案揭示一種可由乾燥粉末吸入器遞送之粉末醫藥組合物，其包含具有本文所揭示之抗TSLP結合分子的粒子，其中活體外總肺劑量大於遞送劑量之90% w/w，且其中該組合物包含至少一個以下特徵：無載劑，粒子密度為0.05至0.3 g/cm<sup>3</sup>；粒子皺度為3至20；粒子藉由包含噴霧乾燥乙醇:水混合物之方法製造；及粒子藉由包含噴霧乾燥乙醇:固體之比率在1與20之間的乙醇:水混合物之方法製造。在一些實施例中，粉末醫藥組合物包含該等特徵中之至少兩者；在其他實施例中，粉末醫藥組合物包含該等特徵中之至少三者。

## 劑量

本文所揭示之抗TSLP分子(包括包含抗TSLP抗體或其片段之醫藥組合物)之劑量、毒性及治療功效可藉由在細胞培養物或實驗動物中之標準醫藥程序來測定，例如以測定LD50 (50%群體致死的劑量)及ED50 (50%群體之治療有效劑量)。毒性作用與治療作用之間的劑量比為治療指數且其可以比率LD50/ED50表示。展現高治療指數之化合物為所需的。雖然可使用展現毒性副作用之化合物，但應小心設計使此類化合物靶向受影響組織部位之遞送系統，以便使對未感染細胞之潛在損害降至最低且由此減少副作用。

自細胞培養分析及動物研究獲得之資料可用於調配一系列用於人類的劑量。此類化合物之劑量較佳處於循環濃度之範圍內，包括毒性很小或無毒性之ED50。劑量可視所用劑型及所用投藥途徑而在此範圍內變化。對於本發明方法中所用之任何化合物，可自細胞培養分析初步估計治療有效劑量。可在動物模型中調配劑量以獲得如在細胞培養物中所測定之包括IC50 (亦即實現症狀半最大抑制之測試化合物的濃度)的循環血漿濃度範圍。此類資訊可用於更準確地判定適用於人類之劑量。血漿中之含量可例如藉由高效液相層析量測。

### 套組

本文亦提供套組，其包括本文所提供之醫藥組合物中之一或多者、用於向個體遞送該醫藥組合物之裝置及使用說明書。在一些實施例中，裝置可遞送呈氣溶膠化形式之醫藥組合物。在一些實施例中，裝置為吸入器，例如乾燥粉末吸入器(DPI)。在其他實施例中，裝置可為定劑量吸入器或噴霧器。

適合的乾燥粉末吸入器包括單位劑量吸入器，其中乾燥粉末儲存於膠囊或泡殼中，且患者在使用之前將一或多個膠囊或泡殼負載至裝置中。或

者，涵蓋多劑量乾燥粉末吸入器，其中劑量預封裝於箔-箔泡殼中，例如藥筒、條帶或轉盤中。

乾燥粉末吸入器包括多劑量乾燥粉末吸入器，諸如DISKUS™ (GSK，美國專利6536427中所述)、DISKHALER™ (GSK，專利申請公開案WO 97/25086中所述)、GEMINI™ (GSK，專利申請公開案WO 05/14089中所述)、GYROHALER™ (Vectura，專利申請公開案WO 05/37353中所述)及PROHALER™ (Valois，專利申請公開案WO 03/77979中所述)。

單劑量乾燥粉末吸入器包括AEROLIZER™ (Novartis，US 3991761中所述)及BREEZHALER™ (Novartis，美國專利8479730中所述(Ziegler等人)。其他適合的單劑量吸入器包括美國專利第8069851號及第7559325號中所述之單劑量吸入器。

一些患者發現更容易且更便利使用以遞送需要每日投與一次之藥劑的單位劑量泡殼吸入器包括美國專利第8573197號(Axford等人)中所述之吸入器。

在一些實施例中，吸入器為多劑量乾燥粉末吸入器，其中使粉末流體化及分配之能量由患者供應(亦即「被動」MD-DPI)。本發明之粉末在低最大吸氣流率(PIF)下有效地流體化及分散。因此，觀測到在PIF下之粉末分散的小變化有效地平衡在PIF增加所發生之慣性碰撞的增加，從而產生流動速率非依賴性肺沈積。本發明之粉末所觀測到的不存在流動速率依賴性驅動總體患者間差異性減小。

使用說明書可包括關於TSLP相關發炎性病狀之診斷或治療的說明書。如本文所提供之套組可根據本文所述之方法中之任一者來使用。熟習此項技術者應瞭解本文所提供之套組的其他適合的用途，且應能夠將該等

套組用於此類用途。如本文所提供之套組亦可包括郵件(例如郵資已付的信封或郵遞包)，其可用以將分析樣品傳回至例如實驗室。套組可包括一或多個樣品容器，或樣品可在標準血液採集小瓶中。套組亦可包括知情同意書、測試申請表及關於如何在本文所述之方法中使用套組之說明書中之一或多者。使用此類套組之方法亦包括在本文中。一或多個表單(例如測試申請表)及容納樣品之容器可例如用條碼編碼以鑑別提供樣品之個體。

### 治療方法

本文提供治療需要治療之個體(例如人類)之SLP相關病狀的方法，其係藉由向該個體投與治療有效量之本文所述之TSLP結合分子中之任一者或其醫藥組合物。在一些實施例中，此類方法另外包括鑑別及選擇需要治療TSLP相關發炎性病狀之個體。本發明亦提供如本文所述之TSLP結合分子或其醫藥組合物治療或預防患者之疾病的用途。在一些實施例中，本發明提供如本文所述之TSLP結合分子或其醫藥組合物，其適用於治療或預防患者之疾病。在其他實施例中，本發明提供如本文所述之TSLP結合分子或其醫藥組合物製造用於治療或預防患者之疾病之藥物的用途。

在一些實施例中，TSLP相關發炎性病狀可由過敏性反應或環境刺激物觸發。在一些特定實施例中，TSLP相關發炎性病狀包括哮喘、慢性阻塞性肺病、過敏性鼻炎、過敏性鼻竇炎、過敏性結膜炎、異位性皮膚炎、嗜伊紅血球性食道炎。

在一些實施例中，TSLP結合分子或包含TSLP結合分子之醫藥組合物例如藉由乾燥粉末吸入器以氣溶膠化形式藉由吸入投與個體。在其他實施例中，TSLP結合分子或醫藥組合物可使用此項技術中已知之多種方法中之一或多者投與。如熟習此項技術者應瞭解，投藥途徑及/或模式將視所需結

果而變化。所選投藥途徑包括靜脈內、肌肉內、皮內、腹膜內、皮下、脊髓或其他非經腸投藥途徑，例如藉由注射或輸注。非經腸投藥可表示除經腸及局部投與外之通常藉由注射的投藥模式，且包括(但不限於)靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、囊內、眶內、心內、皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網膜下、脊椎內、硬膜外及胸骨內注射及輸注。或者，本發明之TSLP結合分子或包含TSLP結合分子之醫藥組合物可經由非不經腸途徑投與，諸如局部、表皮或黏膜投藥途徑，例如鼻內、經口、經陰道、經直腸、舌下或局部。

在一些實施例中，TSLP相關發炎性病狀為哮喘。哮喘為複雜且異質性的呼吸道慢性發炎疾病，其特徵在於可逆的支氣管收縮且與呼吸道對廣泛範圍的支氣管收縮刺激之放大反應相關聯(氣管高反應性；AHR)。最新研究已集中於鑑別哮喘發病機制所涉及之免疫路徑，且已揭露2型輔助T細胞(Th2)及非Th2介導之效應細胞的作用(Lambrecht及Hammad, *Nature immunology* 2014, 16: 45-56)。在特徵在於嗜伊紅血球性炎症及特異反應跡象之過敏性哮喘的情況下，Th2免疫路徑要素在氣管炎症及AHR之出現及維持中至關重要。胸腺基質淋巴生成素(TSLP)為Th2反應之關鍵上游調節因子。TSLP係響應於多種多樣的刺激(例如物理損傷、環境微粒物質、過敏原、促炎性或Th2極化細胞激素及微生物產物)而在氣管內之黏膜上皮細胞中表現。TSLP之作用為調節樹突狀細胞(DC)及誘導原生T細胞分化成發炎性Th2細胞且作為先天性免疫反應之一部分促使肥大細胞、嗜伊紅血球及巨噬細胞分泌細胞激素。另外，TSLP可干擾調節性T細胞出現，損害耐受性與炎症之間的平衡。在特徵在於嗜中性或粒細胞缺乏性炎症之非過敏性哮喘的情況下，亦不理解為細胞激素驅動之炎症，然而，咸信非Th2

介導之細胞激素IL-17及干擾素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )均發揮作用。令人關注的是，除在調節Th2反應中之作用以外，臨床前證據表明TSLP放大非Th2反應且在建立IL-17及IFN- $\gamma$ 介導之慢性炎症中亦可為重要的。

TSLP對於啮齒動物出現Th2細胞激素相關聯之呼吸道炎症為必需且充足的。在界面活性劑蛋白質C啟動子控制下具有TSLP之組成性肺上皮細胞分泌的轉殖基因小鼠出現以下與哮喘相容之特徵：嗜伊紅血球性氣管炎症；表現Th2偏向之CD4 T細胞浸潤；全身性嗜酸性球增多症；IgE增加；氣管高反應性；及顯著氣管重塑，包括杯狀細胞增生及氣管與血管纖維化。為了進一步支持TSLP在過敏性炎症中之作用，亦在吸入之過敏原暴露於肺中之後發現TSLP表現及蛋白質產生增加(Zhou等人, 2005, *Nature immunology* 6, 1047-1053)，而在抗原存在下直接鼻內遞送TSLP導致嚴重疾病快速發作(Headley等人, 2009, *Journal of immunology* 182, 1641-1647)。TSLPR缺陷型小鼠對經典卵白蛋白加礬激活小鼠模型中之Th2樣炎症的出現具抗性(Al-Shami等人, 2005, *The Journal of experimental medicine* 202, 829-839；Zhou等人, 2005, *Nature immunology* 6, 1047-1053)。氣管炎症減弱與血清IgE減少及Th2細胞激素及趨化因子(諸如IL-4、-5、-13、嗜酸性粒細胞趨化因子及胸腺及活化調節之趨化因子(TARC))降低相關。

在重度哮喘患者中特別觀測到氣管固有層中之TSLP表現增加(Shikotra等人, 2012, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129, 104-111.e109)。此外，數個研究已顯示人類TSLP基因座中單核苷酸多形現象(SNP)之頻率及TSLP表現量與哮喘及嗜伊紅血球性食道炎之疾病敏感性之間的關聯(Ferreira等人, 2014, *The Journal of allergy and clinical*

immunology 133, 1564-1571 ; Harada等人, 2011, American journal of respiratory cell and molecular biology 44, 787-793 ; He等人, 2009, The Journal of allergy and clinical immunology 124, 222-229 ; Rothenberg等人, 2010, Nature Genetics 42, 289-291)。在最新研究中，亦發現TSLP基因變異體上位關聯而與兒童哮喘之哮喘風險顯著增加相關聯(Biagini Myers等人, 2014, The Journal of allergy and clinical immunology 134, 891-899 e893)。

### 組合療法

上文所述之各種治療可與其他治療搭配物(諸如TSLP相關發炎性病狀之當前標準護理)組合。因此，本文所述之治療TSLP相關發炎性病狀之方法可另外包括向需要治療之個體投與第二藥劑。在一些實施例中，第二藥劑可選自(但不限於)皮質類固醇、支氣管擴張劑(SABA、LABA、SAMA、LAMA)、抗組織胺、抗白三烯及PDE-4抑制劑。

術語「組合」係指呈一種單位劑型之固定組合或組合投與，其中本發明化合物及組合搭配物(例如，如下文所闡述之另一藥物，亦稱為「治療劑」或「輔劑」)可同時獨立投與或在時間間隔內分開投與，尤其其中此等時間間隔允許組合搭配物顯示協作效應，例如協同效應。單一組分可封裝在套組中或分開封裝。在投與之前組分中之一或兩者(例如，粉末或液體)可復原或稀釋至所需劑量。如本文所用之術語「共投與」或「組合投與」或其類似術語意欲涵蓋向有需要之單一個體(例如患者)投與所選擇之組合搭配物，且意欲包括其中藥劑不一定藉由相同投藥途徑或同時投與的治療方案。如本文所用之術語「醫藥組合」意謂由混合或組合大於一種治療劑所產生之產物且包括治療劑之固定及非固定組合。術語「固定組合」意謂治



療劑，例如本發明化合物及組合搭配物，均以單一實體或劑量形式同時投與患者。術語「非固定組合」意謂治療劑，例如本發明化合物及組合搭配物，均以獨立實體形式同時、並行或依序投與患者而無特定時間限制，其中此類投與在患者體內提供治療有效水準之兩種化合物。後者亦適用於混合液療法，例如投與三種或大於三種治療劑。如本文所用，術語「醫藥組合」係指呈一種單位劑型之固定組合，或用於組合投與之非固定組合或分裝部分之套組，其中兩種或大於兩種治療劑可同時獨立投與或在時間間隔內分開投與，尤其其中此等時間間隔允許組合搭配物顯示協作效應，例如協同效應。

術語「組合療法」係指投與兩種或大於兩種治療劑來治療本發明中所述之治療性病狀或病症。此類投與涵蓋此等治療劑以實質上同時的方式，諸如以具有固定比率之活性成分的單一膠囊形式共投與。或者，此類投與涵蓋各種活性成分在多個或各別容器(例如片劑、膠囊、粉末及液體)中共投與。粉末及/或液體在投與之前可復原或稀釋至所需劑量。另外，此類投與亦涵蓋在大致相同的時間或在不同時間依序使用各類型治療劑。在任一情況下，治療方案將提供藥物組合在治療本文所述之病狀或病症方面的有益作用。

除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語具有與一般熟習本發明所屬技術者通常所理解相同之含義。雖然與本文所述之方法及材料類似或等效之方法及材料可用於實踐本發明，但下文描述適合的方法及材料。本文中所提及之所有公開案、專利申請案、專利及其他參考文獻均以全文引用之方式併入。在有矛盾的情況下，將以本說明書(包括定義)為準。另外，材料、方法及實例僅為說明性的且並不意欲為限制性的。熟習此項

技術者應能識別與本文所述之方法及材料類似或等效之方法及材料，其可用於本發明之實踐中。實際上，本發明決不限於所述方法及材料。

## 實例

### 實例1：使用噬菌體呈現產生人類抗TSLP抗體及其Fab片段

使用MorphoSys HuCAL PLATINUM®噬菌體呈現技術產生特異性結合於人類TSLP同功異型物1 (SEQ ID NO: 27)之Fab。噬菌粒文庫係基於HuCAL®概念(Knappik等人, 2000, J Mol Biol 296, 57-86)且採用CysDisplay™技術以呈現噬菌體表面上之Fab (Lohning, WO 2001/05950)。

## 淘選

進行三種類型之淘選：針對直接塗佈之重組人類TSLP (rhTSLP)之固相淘選、固相類澱粉前驅蛋白質(APP)捕捉淘選及針對TSLP之溶液淘選。

對於針對直接塗佈之rhTSLP之固相淘選，將96孔Maxisorp™盤在4°C下用每孔300 µl源於大腸桿菌之rhTSLP (R&D Systems)塗佈隔夜。對於各淘選，將約 $4 \times 10^{13}$ 個HuCAL PLATINUM®噬菌體-抗體添加至經塗佈之各抗原中且在室溫下在微量滴定盤震盪器上培育2小時。隨後，非特異性結合之噬菌體藉由數個洗滌步驟洗去，且特異性結合之噬菌體使用含25 mM DTT之10 mM Tris/HCl pH 8溶離。將DTT溶離液轉移至14 ml大腸桿菌TG1中且培育以進行噬菌體感染。

將經感染之細菌再懸浮於2×YT培養基，塗覆於LB/Cam瓊脂盤上且培育隔夜。將菌落自盤刮下且用於噬菌體救援、所選純系之多株擴增及噬菌體產生。使用經純化之噬菌體開始下一輪淘選。除抗原量降低及洗滌條件更嚴格以外，根據第一輪之方案進行第二及第三輪固相淘選。

在針對獼猴TSLP之固相APP捕捉淘選中，淘選中所用之抗原具有APP6 (類澱粉-前驅-蛋白質)標籤，且抗原-APP6融合蛋白經由固定於Maxisorp™盤上之小鼠抗APP6抗體捕捉。為防止選擇結合於抗原之APP6標籤或結合於抗APP6捕捉抗體之噬菌體，使用捕捉抗體及不相關的加APP6標籤之抗原預阻斷噬菌體。

96孔Maxisorp™盤在4°C下用300 µl抗APP抗體及不相關的加APP6標籤之抗原塗佈隔夜。在室溫下在震盪器上捕捉抗原人類TSLP\_Avi-APP6或獼猴TSLP\_APP6-Avi，持續1小時。並行地，噬菌體預吸附於抗APP抗體及不相關的抗原上兩次。

除抗原塗佈及噬菌體阻斷程序以外，如同上文所述之固相淘選一般進行捕捉淘選。

對於針對TSLP之溶液淘選，噬菌體用50%人類血清/0.33×化學阻斷劑/0.05% Tween20阻斷。每一噬菌體池，在1×化學阻斷劑中阻斷4 mg 抗生素珠粒(Dynabeads® M-280 抗生素珠粒；Invitrogen)。為了移除抗生素珠粒或珠粒結合之噬菌體，每次使用經阻斷之抗生素珠粒進行經阻斷之噬菌體粒子的預吸附兩次。接著，將經生物素標記之抗原人類TSLP\_Avi-APP6添加至噬菌體粒子中。在培育之後，使用抗生素珠粒捕捉噬菌體-抗原複合物且使用磁力分離器收集結合於抗生素珠粒之噬菌體粒子。非特異性結合之噬菌體藉由使用PBS/0.05% Tween20及PBS之數個洗滌步驟洗去。特異性結合之噬菌體藉由使用含25 mM DTT之10 mM Tris/HCl pH 8自抗生素珠粒分離。根據固相淘選方案進行後續噬菌體感染及噬菌體產生且開始下一輪淘選。

## 表現

為了促進可溶性Fab之快速表現，將所選HuCAL PLATINUM®噬菌體之Fab編碼插入物自pMORPH®30呈現載體次選殖至pMORPH®x11表現載體pMORPH®x11\_FH中。在大腸桿菌TG1-F-單一純系轉型之後，如先前所述進行含有HuCAL®-Fab片段之周質提取物的表現及製備 (Rauchenberger等人, 2003, J Biol Chem 278: 38194-38205)。

將氯黴素抗性單一純系挑選至預填充有2×YT培養基之無菌384孔微量滴定盤的孔中且在37°C下生長隔夜。第二天早晨，將含有甘油之培養基添加至主盤之各孔中；用鋁箔密封盤且儲存在-80°C下。

## ELISA篩選

使用ELISA篩選，自淘選結果中鑑別結合於目標抗原之單一Fab純系。使用含有Fab之粗大腸桿菌溶解物測試Fab。為了檢驗所製備之大腸桿菌溶解物中之Fab表現，用1:1000稀釋於PBS中之Fd片段特異性綿羊抗人類IgG塗佈Maxisorp™ 384孔。在用含有0.05% Tween20之含5%脫脂奶粉之PBS阻斷之後，添加含有Fab之大腸桿菌溶解物。隨後，藉由與結合於鹼性磷酸酶之F(ab)2特異性山羊抗人類IgG (1:5000稀釋)一起培育，接著添加AttoPhos螢光受質(Roche, #11681982001)來偵測所結合之HuCAL®-Fab片段。在430 nm激發下記錄535 nm之螢光發射。

為了對直接塗佈之抗原進行ELISA篩選，用含2 µg/ml濃度之不同TSLP抗原之PBS塗佈Maxisorp™ 384孔盤。在用含5%脫脂奶粉之PBS阻斷盤之後，添加含有Fab之大腸桿菌溶解物。藉由結合於鹼性磷酸酶之F(ab)2特異性山羊抗人類IgG(1:5000稀釋)使用Attophos螢光受質(Roche, #11681982001)偵測Fab之結合。在430 nm激發下記錄535 nm之螢光發射。

為了對APP捕捉之抗原進行ELISA篩選，用含2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度之抗APP特異性抗體之PBS塗佈Maxisorp™ 384孔盤。在用含5%脫脂奶粉之PBS阻斷盤之後，使2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度之加APP標籤之TSLP抗原在室溫下結合1小時。接著添加含有Fab之大腸桿菌溶解物。藉由結合於鹼性磷酸酶之F(ab)2特異性山羊抗人類IgG(1:5000稀釋)使用Attophos螢光受質(Roche, #11681982001)偵測Fab之結合。在430 nm激發下記錄535 nm之螢光發射。

為了進行經生物素標記之抗原的ELISA篩選，分別用1:1000稀釋於PBS中之Fd片段特異性綿羊抗人類IgG (The binding site, #PC075)或抗His特異性小鼠IgG (R&D Systems, #MAB050)塗佈Maxisorp™ 384孔盤。在用含5%脫脂奶粉之PBS阻斷之後，添加含有Fab之大腸桿菌溶解物。隨後，使所捕捉之HuCAL®-Fab片段分別結合於0.7 - 1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 經生物素標記之hu TSLP、hu TSLP或cy TSLP，其藉由與結合於鹼性磷酸酶之抗生蛋白鏈菌素一起培育，接著添加AttoPhos螢光受質(Roche, #11681982001)來偵測。在430 nm激發下記錄535 nm之螢光發射。

經生物素標記之抗原(2.5 - 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )亦捕捉於經中性抗生物素蛋白塗佈之盤。在用含5%脫脂奶粉之PBS阻斷之後，添加含有Fab之大腸桿菌溶解物。藉由結合於鹼性磷酸酶之F(ab)2特異性山羊抗人類IgG(1:5000稀釋)使用Attophos螢光受質(Roche, #11681982001)偵測Fab之結合。在430 nm激發下記錄535 nm之螢光發射。

在對塗佈於NA盤上之經生物素標記之人類TSLP\_Avi-APP6及經生物素標記之獼猴TSLP\_APP6-Avi進行初級ELISA篩選時，分析9984個純系(384個純系/淘選子碼)(參見3.4.4)。使用GENios Pro程式「PrimeScreen」分析ELISA結果。相較於背景信號分析結果。僅選擇對於人類抗原而言信

號 $>10\times$ 背景之孔且對於獼猴抗原而言信號 $>5\times$ 背景之孔作為陽性。低於 $5\times$ 背景之信號可能為Fab表現量低、Fab親和力低、微量滴定盤之邊緣效應或不可再現值之結果。溶液淘選產生3133個初級命中物，固相淘選產生240個初級命中物。在二級ELISA篩選中進一步分析1472個所選初級命中物。

在二級ELISA篩選中使用不同抗原呈遞模式，包括C端或N端加Avi-APP6標籤之抗原、直接塗佈之抗原、溶液中存在之經生物素標記之抗原、源於HEK之抗原、源於大腸桿菌之抗原、抗原之去糖基化變異體(經PNG酶處理)。另外，在二級篩選中分析與反目標IL-7之非特異性結合。為了排除生物素-結合劑及標籤-結合劑，使用經生物素標記之不相關的加APP-Avi標籤之抗原。使用GENios Pro程式「PrimeScreen」分析ELISA結果且相較於背景信號分析結果。對於不相關的抗原及反目標IL-7，僅選擇信號 $<2$ 倍背景之命中物。

二級篩選之結果表明抗原呈遞模式對於交叉反應性至關重要。對於去糖基化之抗原的篩選顯示可存在靶向糖基-抗原決定基之結合劑。此外，標籤位置及標籤組成可由於構形變化而影響交叉反應性。純系根據其交叉反應性概況分組，產生七個不同交叉反應性組。第1-3組包含與單獨或與源於HEK之抗原組合的源於大腸桿菌之huTSLP交叉反應的所有純系。第4組包括至少與溶液中存在之人類TSLP\_Avi-APP6交叉反應的所有純系。相比之下，第5組包括專門與溶液中之人類TSLP\_Avi-APP6交叉反應的所有純系。在第6組中，存在與人類TSLP\_Avi-APP6及與去糖基化之人類TSLP\_Avi-APP6交叉反應的所有純系，且在第7組中，存在與包括去糖基化抗原之所有源於HEK之抗原交叉反應的所有純系。

### **定序及轉化成IgG**

對出自交叉反應性第1-3組之73個純系(與源於大腸桿菌之TSLP交叉反應的純系)及出自第4-7組之569個純系(與源於HEK之抗原交叉反應的純系)進行序列分析。總共鑑別297個HCDR3獨特的純系，222個純系為合併的，且124個純系以Fab格式純化。

來源於第三及第四定序分析之純系立即進入IgG轉化，且隨後選殖至pMORPH®4\_IgG1f載體中以便在哺乳動物細胞中表現。

### 親和力測定

純系之HuCAL® Fab及IgG版本的解離常數( $K_D$ )測定如下進行：在室溫下將含0.2  $\mu\text{g/ml}$ 經生物素標記之人類TSLP之分析緩衝液塗佈於抗生素鏈菌素MSD盤上1小時。在抗原塗佈之前，抗生素鏈菌素盤在4°C下用具有3% BSA之PBS阻斷隔夜。在下文所述之條件下，使用人類TSLP及獼猴TSLP進行溶液平衡滴定(SET)。使用抗體蛋白質之單體級分(至少90%單體含量，藉由分析型SEC分析；分別地，Superdex75 (Amersham Pharmacia)用於Fab或Tosoh G3000SWXL (Tosoh Bioscience)用於IgG)。

溶液中之親和力測定基本上如文獻(Friquet等人, 1985, J Immunol Meth 77, 305-319)中所述進行。為了提高SET方法之靈敏性及精確性，將其自經典ELISA轉變成基於ECL之技術(Haenel等人, 2005, Anal Biochem 339, 182-184)。根據製造商說明書，用MSD磺基-TAG™ NHS-酯(Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA)標記1 mg/ml山羊抗人類(Fab)2片段特異性抗體(Dianova)。

在聚丙烯微量滴定盤中且含有0.5% BSA及0.02% Tween-20之PBS pH 7.4作為分析緩衝液進行實驗。未標記之抗原以高於預期 $K_D$ 至少10倍之濃度起始進行 $2^n$ 連續稀釋。使用無抗原之孔測定 $B_{\text{max}}$ 值；使用僅含有分析

緩衝液之孔測定背景。在添加適當量結合劑(抗體濃度類似於或低於預期  $K_D$ ，60  $\mu$ l最終體積)之後，混合物在室溫下培育隔夜。

用抗原塗佈MSD盤(30微升/孔)。在用具有0.02% Tween-20之PBS洗滌盤之後，將經平衡之樣品轉移至彼等盤(30微升/孔)且培育20分鐘。在洗滌之後，將30微升/孔經MSD-磺基-標籤標記之偵測抗體(抗人類(Fab)2，最終稀釋度通常為1:2,000)添加至MSD盤中且在室溫下在Eppendorf震盪器(700 rpm)上培育30分鐘。

在洗滌MSD盤且添加30微升/孔具有界面活性劑之MSD讀取緩衝液T之後，使用Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA)偵測電化學發光信號。

藉由XLfit (IDBS)軟體使用定製擬合模型評估資料。關於Fab分子之  $K_D$  測定，使用以下擬合模型(根據Haenel等人, 2005)，根據(Abraham等人, 1996))修改：

$$y = B_{\max} - \left( \frac{B_{\max}}{2[Fab]_t} \left( [Fab]_t + x + K_D - \sqrt{([Fab]_t + x + K_D)^2 - 4x[Fab]_t} \right) \right)$$

$[Fab]_t$ ：所施用之總Fab濃度

$x$ ：所施用之總可溶性抗原濃度(結合位點)

$B_{\max}$ ：在無抗原之情況下Fab的最大信號

$K_D$ ：親和力

關於IgG分子之  $K_D$  測定，使用以下IgG之擬合模型(根據Piehler等人, 1997修改)：

$$y = \frac{2B_{\max}}{[IgG]} \left( \frac{[IgG]}{2} - \frac{\left( \frac{x + [IgG] + K_D}{2} - \sqrt{\frac{(x + [IgG] + K_D)^2}{4} - x[IgG]} \right)^2}{2[IgG]} \right)$$



[IgG]：所施用之總IgG濃度

x：所施用之總可溶性抗原濃度(結合位點)

$B_{\max}$ ：在無抗原之情況下IgG的最大信號

$K_D$ ：親和力

親和力亦可藉由使用Biacore 3000或T200儀器(Biacore, GE Healthcare)測定動力學速率常數之Biacore表面電漿子共振(SPR)來測定。經由直接塗佈之抗原的Biacore  $K_D$ 測定基本上如下進行：在SA晶片(Biacore, GE Healthcare)上捕捉50 RU經生物素標記之抗原人類TSLP。參考流量槽1保持空白。在30  $\mu\text{l}/\text{min}$ 之流動速率下，使用PBS pH7.2 GIBCO + 0.05% Tween 20作為操作緩衝液。使用範圍介於3.9至500 nM之Fab濃度，其中注射體積為45  $\mu\text{l}$ 且解離時間為300秒。藉由2次注射5  $\mu\text{l}$  10 mM甘胺酸 pH 1.5進行結合分析物之再生。使原始資料擬合於1:1結合模型，其中參數  $R_{\max}$ 設定成局部且RI設定成0。

### 親和力成熟

選擇七種Fab候選物用於親和力成熟。為了增加所選Fab之親和力及生物活性，藉由使用三核苷酸定向誘變之卡匣誘變並行地使L-CDR3及HCDR2區最佳化(Virnekas等人, 1994, *Nucleic Acids Res* 22: 5600-5607)，而構架區保持恆定。為了使親本Fab片段之L-CDR3最佳化，藉由酶分解移除結合劑池之輕鏈(405 bp)的LCDR3、構架4及恆定區且經多樣化L-CDR3譜系連同構架4及恆定域置換。在第二文庫集中，H-CDR2多樣化，而連接構架區保持恆定。使接合混合物電穿孔進入4 ml大腸桿菌TOP10F細胞中，產生108至109個獨立的菌落。此文庫大小確保理論多樣性之覆蓋範圍。如(Rauchenberger等人, 2003, *J Biol Chem* 278:

38194-38205)所述進行文庫擴增。為了控制品質，隨機挑選單一純系且定序。為了選擇親和力改良之結合劑，使用經生物素標記之抗原人類 TSLP\_Avi-APP6及獼猴TSLP\_APP6-Avi對來源於成熟文庫之噬菌體進行三輪溶液淘選。藉由降低每輪淘選之抗原濃度增加嚴格性(Low等人, 1996, J Mol Biol 260, 359-368. 1996.)。除抗原減少以外，進行解離速率選擇(Hawkins等人, 1992, J Mol Biol 226, 889-896)。此與在室溫下延長隔夜的洗滌步驟組合。

為了進一步增加一些所選抗體片段之親和力及生物活性，藉由使用三核苷酸定向誘變之卡匣誘變並行地使L-CDR1、L-CDR3、H-CDR2、H-CDR1區最佳化(Virnekas等人, 1994, Nucleic Acids Res 22: 5600-5607)，而構架區保持恆定。

CDR中不需要翻譯後修飾(PTM)，因為此類抗體之效力可能視PTM之位置而潛在地降低，另外，PTM可能產生不均勻混配。在親和力成熟前，產生不含NG、NS及DG位點之變異體且與親本純系一起包括於池中，旨在於選擇過程期間選擇移除PTM之變異體。在關於人類TSLP之ELISA中測試所產生之變異體的含有Fab之粗細菌細胞溶解物的抗原結合。變異體之質體DNA與親本DNA混合以產生成熟文庫。

為了基於由Haenel等人, 2005, Anal Biochem 339: 182-184所述之原理藉由溶液平衡滴定對成熟的結合劑進行排序，用不同濃度之抗原平衡恆定量的經稀釋之BEL提取物隔夜。接著，將混合物轉移至事先用抗原塗佈之MSD盤，且在培育及洗滌之後，添加適合的經MSD-磺基-標籤標記之偵測抗體。隨後，使用Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD, USA)經由ECL偵測定量未結合之Fab的濃度。使用

XLfit (IDBS)軟體處理結果，應用相應的擬合模型估計親和力且因此鑑別藉由成熟改良最多的純系。

### **產生**

用編碼抗TSLP Fab或IgG之重鏈及輕鏈的pMORPH®4表現載體DNA轉染真核HKB11細胞。轉染後3或6天收集細胞培養物清液層。在無菌過濾之後，使用液體操作台對溶液進行蛋白質A親和層析(MabSelect SURE, GE Healthcare)。若未另外陳述，則將緩衝液更換成1×杜爾貝科氏PBS (Dulbecco's PBS ; pH 7.2, Invitrogen)且無菌過濾(0.2 µm孔徑)樣品。藉由UV分光光度法測定蛋白質濃度且在變性、還原條件下使用Labchip System (Perkin Elmer, USA)分析IgG之純度。

### **抗TSLP Fab1**

抗TSLP Fab1來源於MOR011086家族，其在初步淘選中鑑別。MOR011086之親和力成熟產生MOR014051，其在HC-CDR2中包括DG翻譯後修飾基元。移除此DG基元產生MOR14701 (DG→DA)，其接著經生殖系化以產生MOR014824，亦即表2中之Mab1。表2中之抗TSLP Fab1為Mab1之Fab片段。

藉由Kabat、Chothia或組合編號方案測定抗TSLP Fab1重鏈CDR (HCDR)、輕鏈CDR (LCDR)之胺基酸序列以及重鏈及輕鏈可變區之胺基酸序列且在表2中列出。如藉由SET所測定，抗TSLP Fab1以極高親和力( $K_D=6$  pM)結合於重組人類TSLP。抗TSLP Fab1不結合於結構上類似之細胞激素IL-7。

**實例2：在報導體基因分析中抗TSLP Fab1針對重組及天然分泌之人類TSLP的效力**

在螢光素酶報導體基因分析中測試抗TSLP Fab1針對重組人類TSLP、天然分泌之人類TSLP及獼猴TSLP的效力。

### 材料及方法

天然分泌之人類TSLP係藉由用IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及IL-13刺激24小時而自人類肺纖維母細胞獲得。

Ba/F3細胞經hTSLPR、hIL7R $\alpha$ 及Stat5-螢光素酶報導體構築體轉染。Stat5為TSLP信號傳導之下游效應子。細胞在細胞生長培養基中生長：具有10% FCIII (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)、1%青黴素/鏈黴素 (Invitrogen, Grand Island, NY)、1  $\mu$ g/ml嘌呤黴素(Sigma, St. Louis, MO)及5 ng/ml重組人類TSLP (rhTSLP, R&D Systems, Minneapolis, MN)之RPMI 1640 (Invitrogen, Grand Island, NY)。使用具有10% FCIII、1%青黴素/鏈黴素及1  $\mu$ g/ml嘌呤黴素之RPMI 1640製造報導體分析緩衝液。

Ba/F3細胞在T162cm<sup>2</sup>燒瓶中懸浮生長且一週分裂1:50兩次。收集Ba/F3細胞且在對數生長中期藉由在200 $\times$ g下離心5分鐘集結並在無TSLP之細胞生長培養基中洗滌。重複此舉且隨後在無TSLP之條件中培育18-24小時。第二天，細胞藉由在200 $\times$ g下離心5分鐘而再次集結，且再懸浮於報導體分析緩衝液中達到1 $\times$ 10<sup>6</sup>個細胞/毫升的細胞濃度。10  $\mu$ L之1 $\times$ 10<sup>6</sup>個細胞/毫升的Ba/F3細胞在白色96孔Optiplate (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts)之各孔中與70  $\mu$ L報導體分析緩衝液組合。此後為10  $\mu$ L之6點1:10連續稀釋之抗體(100 nM最高最終濃度)且在含濕氣培育箱中在37 $^{\circ}$ C/5% CO<sub>2</sub>下培育30分鐘。最後，密封10  $\mu$ L之0.5 ng/mL人類或獼猴TSLP或經計算具有相同相對活性之濃度的天然分泌之TSLP及盤以減少蒸發，且在含濕氣培育箱中在37 $^{\circ}$ C/5% CO<sub>2</sub>下培育4小時。盤接著自培育箱移出，且允

許平衡至室溫約15分鐘。此後向各孔中添加100  $\mu$ L Steady-Glo試劑 (Promega, Madison, WI)且在室溫下培育20分鐘。接著在Envision儀器上使用發光程序(照相機曝光1秒/孔)讀取盤且在Microsoft Excel及Graphpad 稜柱中分析資料。

## 結果

抗TSLP Fab1在螢光素酶報導體基因分析中顯示出極好的針對TSLP之全部三種形式的效力，其中針對重組人類TSLP (1 ng/ml)之IC<sub>50</sub>為15.4 pM，針對天然分泌之人類TSLP的IC<sub>50</sub>為17.1 pM且針對獼猴TSLP之IC<sub>50</sub>為10.8 pM。當計算多次實驗(n=3)之平均報導體基因分析結果時，Fab1針對重組人類TSLP之平均IC<sub>50</sub>值為15.3 pM  $\pm$  1.5 pM SEM。Fab1針對獼猴TSLP之平均IC<sub>50</sub>值為9.5 pM  $\pm$  0.9 pM SEM。

因此，抗TSLP Fab1為人類及獼猴TSLP的強力抑制劑，其具有皮莫耳效力。抗TSLP Fab1顯示出極好的針對自人類肺纖維母細胞天然分泌之TSLP的效力的實情降低由體內活性人類TSLP與用於產生抗TSLP Fab之重組人類TSLP的差異性糖基化引起問題的可能性。

### 實例3：藉由抗TSLP Fab1抑制TSLP誘導之初級人類周邊血液單核細胞 (PBMC)的TARC (胸腺及活化調節之趨化因子)分泌

為了測定抗TSLP Fab1是否能夠在初級細胞驅動之反應的情形下中和TSLP，在抗TSLP Fab1存在或不存在下測試人類或獼猴TSLP誘導之人類PBMC的TARC分泌。

## 材料及方法

用肝素(Sigma, St. Louis, MO)處理取自於健康供體之靜脈血液且採集於50 mL針筒並隨後分成兩個無菌離心管，每管25 ml。此等管在低加速

度及減速度下在1200 rpm下離心20分鐘，隨後使用Pasteur吸液管移除血漿層。自每管轉移20 ml血液至新的50 ml離心管中且向每管中添加20 mL PBS (1×, Invitrogen, Grand Island, NY)及10 mL 4%葡聚糖(w/v, Sigma, St. Louis, MO)。將管顛倒以徹底混合血液及葡聚糖且接著在室溫下培育30分鐘以使得紅血球沈降。將20 mL清液層轉移至新的50 ml離心管且用30 ml PBS (1400 rpm, 8分鐘)洗滌，隨後抽吸清液層並將細胞集結粒再懸浮於10 mL PBS中。

為了溶解紅血球，將20 mL無菌冷蒸餾水(Sigma, St. Louis, MO)添加至細胞中且用20 ml stripette混合1分鐘，隨後添加20 ml無菌冷2×PBS以停止溶解。將管顛倒數次且在1400 rpm下離心8分鐘，隨後彙集至一個管中且用分析緩衝液洗滌兩次(1400 rpm, 8分鐘)。分析緩衝液用具有10%人類AB血清(Life Technologies, Grand Island, NY)及1%青黴素/鏈黴素(Invitrogen, Grand Island, NY)之RPMI 1640 (GlutaMax, Invitrogen, Grand Island, NY)製造。

將細胞計數且以 $10 \times 10^6$ 個細胞/毫升之濃度再懸浮，添加100  $\mu$ l至96孔平底盤之各孔中( $1 \times 10^6$ 個細胞/孔)。向各孔中添加50微升/孔抗TSLP抗體且在37°C下保持培育30分鐘，隨後添加人類或獼猴TSLP，得到1 ng/ml TSLP (66 pM)之最終濃度。培育細胞24小時，隨後使盤在1300 rpm下離心5分鐘且收集清液層用於藉由ELISA之胸腺及活化調節之趨化因子(TARC)分析。清液層儲存在-20°C下，直至將其解凍用於TARC ELISA分析為止(樣品經測試為純的)。

按照製造商方案(R&D Systems, Minneapolis, MN)進行TARC ELISA分析。簡言之，捕捉抗體在無載體蛋白質之PBS中稀釋至工作濃度。用100

微升/孔經稀釋之捕捉抗體塗佈Microplate immuno maxiSorp盤(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)，用頂部密封黏合蓋密封盤且在室溫下培育隔夜。第二天，抽吸捕捉抗體且用洗滌緩衝液洗滌盤，重複該過程兩次，總計洗滌三次。藉由使用歧管分配器或自動洗滌器用300  $\mu$ L洗滌緩衝液填充各孔來洗滌各孔。在最後一次洗滌後，藉由將盤顛倒棄去剩餘洗滌緩衝液且將其相抵於乾淨的紙巾進行墨點法。接著，藉由向各孔中添加300  $\mu$ L試劑稀釋劑(含1% BSA之PBS)阻斷盤。盤在室溫下培育最少1小時。重複洗滌步驟且每孔添加100  $\mu$ L含樣品或標準品之試劑稀釋劑。盤用黏合帶覆蓋且在室溫下培育2小時。接著重複抽吸/洗滌步驟且向各孔中添加100  $\mu$ L經稀釋之偵測抗體，用新黏合帶覆蓋且在室溫下培育2小時，隨後如先前所述重複洗滌步驟。向各孔中添加100  $\mu$ L抗生蛋白鏈菌素-HRP之工作稀釋液且接著將盤再覆蓋並在室溫下培育20分鐘，避免將盤置於直射光下。接著重複抽吸/洗滌步驟且向各孔中添加100  $\mu$ L TMB受質溶液。盤在室溫下在黑暗中培育至多20分鐘，接著添加50  $\mu$ L終止溶液。將盤溫和地敲打以確保各孔混合且立即使用設定成450 nm之微量培養盤讀取器測定各孔之光密度。

## 結果

抗TSLP Fab1為重組人類TSLP誘導之人類PBMC之TARC分泌的極強力抑制劑，其針對1 ng/ml重組人類TSLP之IC<sub>50</sub>為20.3 pM且IC<sub>90</sub>為99.65 pM。抗TSLP Fab1展示為獼猴TSLP誘導之人類PBMC之TARC分泌的強力抑制劑，其針對1 ng/ml重組獼猴TSLP之IC<sub>50</sub>為11.3 pM。當計算多次實驗(n=3)之平均人類PBMC結果時，Fab1針對重組人類TSLP之平均IC<sub>50</sub>值為19.7 pM  $\pm$  1.9 pM SEM。Fab1針對獼猴TSLP之平均IC<sub>50</sub>值為11.1 pM  $\pm$  0.5

pM SEM。

**實例4：藉由抗TSLP Fab1抑制TSLP誘導之初級獼猴周邊血液單核細胞(PBMC)的MDC (源於巨噬細胞之趨化因子)分泌**

### 材料及方法

將獼猴靜脈血液採集至Covance (Dedham, MA)之含有肝素鋰之真空管中。將來自各供體之30 ml血液轉移至50 ml離心管中且在低加速度及減速度下在1200 rpm下離心20分鐘，隨後使用Pasteur吸液管移除血漿層，在層間留下0.5 cm間隙。使剩餘底層細胞再懸浮且轉移10 ml至新的離心管，接著轉移10 ml 1×PBS及5 ml 4%葡聚糖(w/v, Sigma, St. Louis, MO)，隨後將管顛倒4-5次以澈底混合。所有管在室溫下在通風櫥中培育25分鐘以使得RBC沈降在管底部。將10 mL清液層轉移至新的50 ml離心管且用40 ml培養基(1400 rpm，8分鐘)洗滌，隨後抽吸清液層並將細胞集結粒再懸浮於5 mL 1×PBS中。

為了溶解紅血球，將20 mL無菌冷蒸餾水(Sigma, St. Louis, MO)添加至細胞中且用20 ml stripette混合1分鐘，隨後添加20 ml無菌冷2×PBS以停止溶解。將管顛倒數次且在1400 rpm下離心8分鐘，隨後彙集至一個管中且用培養基洗滌兩次(1400 rpm，8分鐘，4°C)。培養基用具有10% Fetal clone III (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)及1%青黴素/鏈黴素(Invitrogen, Grand Island, NY)之RPMI 1640 (GlutaMax, Invitrogen, Grand Island, NY)製造。

使用錐蟲藍染料對細胞進行計數且將細胞以 $10 \times 10^6$ 個細胞/毫升之濃度再懸浮，添加100  $\mu$ l至96孔平底盤之各孔中( $1 \times 10^6$ 個細胞/孔) 向各孔中添加50微升/孔抗TSLP抗體(100 nM最高最終濃度)且在37°C下保持培育30



分鐘，隨後添加獼猴TSLP，得到0.5 ng/ml TSLP (33 pM)之最終濃度。培育細胞24小時，隨後將盤在1400 rpm下離心8分鐘且收集清液層用於藉由ELISA分析源於巨噬細胞之趨化因子(MDC、CCL22)。清液層儲存在-20°C下，直至將其解凍用於MDC ELISA分析(在添加至ELISA盤之前1:2稀釋於分析緩衝液中)為止。按照製造商方案(R&D Systems, Minneapolis, MN)進行MDC ELISA分析。

## 結果

抗TSLP Fab1展示為重組獼猴TSLP誘導之獼猴PBMC之MDC分泌的強力抑制劑，其針對0.5 ng/ml重組獼猴TSLP之IC<sub>50</sub>為55.5 pM。當計算多次實驗(n=3)之平均獼猴PBMC結果時，Fab1針對獼猴TSLP之平均IC<sub>50</sub>值為25.1 pM ± 5.9 pM SEM。

## 實例5：抗TSLP Fab1之物種交叉反應性

### 材料及方法

進行Biacore表面電漿子共振(SPR)結合分析以確定抗TSLP Fab1是否結合於人類、小鼠或大鼠TSLP蛋白質。Biacore試劑，包括S系列感測器晶片CM5、HBS-EP+緩衝液、人類Fab捕捉套組、EDC (1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)-碳化二亞胺)、NHS (N-羥基丁二醯亞胺)、乙醇胺、BIA標準化溶液、70% (w/w)甘油及甘胺酸，購自GE Healthcare。用於Fab捕捉及TSLP結合分析之操作緩衝液為具有10 mM HEPES (pH 7.4)、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.05% v/v界面活性劑P20之1× HBS-EP+。重組人類、獼猴或小鼠TSLP (MW 15 kDa)獲自R&D Systems (Minneapolis, MN)。重組大鼠TSLP (MW 15.4 kDa)獲自USCN Life Science Inc. (Wuhan, China)。

使用捕捉方法以製備在Biacore CM5晶片上之抗TSLP Fab1，隨後注

射人類、小鼠或大鼠TSLP。按照製造商說明書，使用人類Fab捕捉套組將人類Fab結合劑固定於CM5晶片之全部四個流量槽中。規定在10 uL/min之流動速率下的接觸時間為360秒。樣品隔室之溫度為10°C且分析溫度為25°C；在固定之前，CM5晶片用HBS-EP+激活且用BIA標準化溶液標準化。藉由使15 uL之0.5 mg/mL儲備液與360 uL之pH5固定緩衝液(均提供於人類Fab捕捉套組中)組合來製備375 uL之20 ug/mL人類Fab結合劑。所得固定含量為在Fc1、2、3及4中大約4000-4400RU人類Fab結合劑。

使用定製Biacore方法建立動力學分析，其中每一循環捕捉約14RU抗TSLP Fab1。此藉由以10 uL/min之流動速率注射於HBS-EP+緩衝液中之5 nM抗TSLP Fab1，接觸時間60秒，接著30秒穩定期來達成。樣品隔室之溫度為10°C且分析溫度為25°C。使用此定製Biacore方法，建立動力學分析以評估hTSLP、mTSLP及rTSLP與所捕捉之抗TSLP Fab1的相互作用。對於每一抗原，在HBS-EP+中製備以下10種濃度且注射於抗TSLP Fab1表面上，包括0 nM緩衝液空白、10 nM、5 nM、2.5 nM、1.25 nM、0.625 nM、0.313 nM、0.156 nM、0.078 nM、0.039 nM、0.02 nM。在捕捉約14RU抗TSLP Fab1之後，以45 uL/min注射抗原360秒，接著600秒(對於所有測試濃度)或1200秒(對於0 nM及2.5 nM抗原濃度)解離時間。在每一循環之後，藉由10 uL/min注射10 mM甘胺酸-HCl pH 2.0歷時60秒，接著用HBS-EP+緩衝液額外洗滌來達成Fab結合劑表面之再生。樣品隔室之溫度為10°C且分析溫度為25°C。

在由Biacore T200控制軟體控制之Biacore T200儀器上運行所有SPR實驗及分析。使用Biacore T200評估軟體處理資料。標繪減去空白之感測器圖譜用於抗TSLP Fab1之種間交叉反應性的定性分析。

## 結果

Biacore SPR交叉反應性實驗結果顯示抗TSLP Fab1與重組人類TSLP緊密結合，而不存在與重組大鼠或小鼠TSLP之可偵測的結合，其與人類與啮齒類動物TSLP之間的低同源性(約40%)相符。

抗TSLP Fab1以極高親和力結合於食蟹獼猴重組TSLP且在螢光素酶報導體基因分析中為重組獼猴TSLP之極強力抑制劑(針對1 ng/ml重組TSLP之 $IC_{50} = 10.8$  pM)。在初級人類及獼猴PBMC分析中，抗TSLP Fab1為重組獼猴TSLP誘導之人類PBMC之TARC分泌( $IC_{50} = 11.3$  pM)及重組獼猴TSLP誘導之獼猴PBMC之MDC分泌( $IC_{50} = 55.5$  pM)的極強力抑制劑。

因此，抗TSLP Fab1顯示受限的物種交叉反應性，識別重組食蟹獼猴TSLP，但不識別大鼠或小鼠TSLP。

### 實例6：小鼠抗TSLP抗體在哮喘之鼠類疾病模型中的功效

#### 材料及方法

在全身性卵白蛋白(OVA)敏感化接著局部抗原攻擊肺之鼠類模型中評定TSLP中和對於過敏性氣管反應之作用。此模型之特徵在於出現Th2表型及相關嗜伊紅血球性炎症。由於實例1之抗TSLP Fab1如實例5中所述不與啮齒類動物TSLP蛋白質交叉反應，故使用市售替代性抗小鼠TSLP單株抗體(MAB555, R&D Systems, Minneapolis, MN)評定TSLP中和之作用，該單株抗體據報導完全中和重組鼠類TSLP之生物活性，其針對0.5 nM鼠類TSLP之 $IC_{50}$ 為約1.3 nM(資料由R&D Systems供應)。針對所有細胞激素及趨化因子之特定ELISA套組亦購自R&D systems。

雌性Balb/c小鼠在第1天及第14天經OVA (或生理食鹽水)及鑿作為佐

劑免疫接種。簡言之，小鼠腹膜內經含有吸附於1.6 mg氫氧化鋁(Sigma)中之100 µg卵白蛋白(5×結晶，Sigma, UK)的0.2 mL 0.9 % wt/vol NaCl (生理食鹽水)免疫接種。在第21天，小鼠用以氣溶膠形式給與之OVA或生理食鹽水攻擊且在稍後24小時處死。藉由支氣管肺泡灌洗術(BAL)內之差異性及總細胞計數評定炎症，同時藉由特異性ELISA量測細胞激素及趨化因子。

在最後一次鼻內OVA或PBS攻擊之後二十四小時，小鼠藉由腹膜內注射4 mg/Kg戊巴比妥鈉(Rhone Merieux, Harlow, UK)而經麻醉。藉由氣管插管且用總共1.2 ml生理食鹽水溶液洗滌肺(3次，每次0.4 mL)來收集BAL流體。對於各樣品，測定總細胞計數且進行細胞離心塗片製備(Shandon Scientific Ltd., Cheshire, UK)。細胞用Diff-Quik (Baxter Dade AG, Dudingen, Switzerland)染色且使用標準形態準則進行200個細胞之分類計數。

為了評定TSLP消除對於反應致敏階段之作用，在OVA致敏之前一小時靜脈內投與抗鼠TSLP單株抗體(10 mg/Kg)或大鼠IgG2a同型對照且在第14天加打之前再次投與。為了評定TSLP在攻擊時的作用，一些小鼠僅在第21天OVA氣溶膠化之前一小時給與抗體。在靜脈內投與此等抗體時未觀測到不良效應。

結果表示為指示數目之實驗的平均值  $\pm$  SEM。使用單因素方差分析(ANOVA)確定各組中之顯著性。若發現顯著差異，則使用未配對學生T檢驗評定平均值之間的可比性。 $p \leq 0.05$ 之值視為顯著的。

## 結果

OVA致敏及攻擊使得支氣管肺泡灌洗術流體內之細胞數目相較於對照動物增加，該等細胞包括嗜伊紅血球及嗜中性白血球(圖3)。此與先前在

單一抗原攻擊後經歷的反應相符。此外，經OVA致敏/攻擊之小鼠之灌洗流體內的多種炎性介體相較於對照物亦上調(圖4A-圖4C)。

抗鼠類TSLP抗體處理(10 mg/kg)顯著抑制BAL流體內之細胞總數達大致50%，而嗜伊紅血球計數降低80%。在不存在抗原致敏之情況下的抗體處理未顯著改變灌洗物之基線細胞組成。對TSLP活性之下游標記之分析揭露與過敏性氣管炎症相關聯之細胞激素IL-13 (圖4A)及趨化因子嗜酸性粒細胞趨化因子-2及TARC (圖4B及圖4C)之含量減少，該等趨化因子均為由TSLP刺激之樹突狀細胞產生之Th2細胞及嗜伊紅血球的已知化學引誘劑。

### 實例7：抗TSLP Fab1在大鼠中之藥物動力學表徵

#### 材料及方法

在靜脈內(IV)快速注射、氣管內滴入(ITI)或20分鐘僅鼻吸入1 mg/kg單一標稱劑量之噴霧抗TSLP Fab1之後，在大鼠中研究抗TSLP Fab1之藥物動力學(PK)及肺沈積。在多個給藥後時間點測定血漿、BAL流體以及肺組織勻漿樣品中之抗TSLP Fab1濃度(在BAL及血液灌注經肺血管結構之後)。

#### 結果

在IV注射之後，抗TSLP Fab1自體循環快速清除，平均終末消除半衰期為約3小時。在ITI或吸入之後，抗TSLP Fab1緩慢吸收至體循環中，兩種途徑均在約2小時達到血漿C<sub>max</sub>，且平均終末半衰期長於在IV投與之後測定的平均終末半衰期(與在IV之後3小時相比，在ITI之後7小時及在吸入之後4小時)，表明吸收速率限制之動力學。抗TSLP Fab1之全身性生物可用率平均在ITI之後約6%及在吸入之後1%，可能歸因於在ITI之後之肺沈積

分數相較於吸入較高。在ITI或吸入之後，BAL流體及肺組織勻漿中之抗TSLP Fab1濃度與低全身性暴露量相比高得多(>100倍以上)，在給藥後2、6、24或72小時佔自全部三種基質回收之總劑量的97-99% (對於BAL，66-79%，且對於肺，20-31%)。BAL及肺勻漿中抗TSLP Fab1所估計之沈積半衰期分別平均約7及9小時。

### 實例8：抗TSLP Fab1在猴中之藥物動力學表徵

#### 材料及方法

在以1、10及20 mg/kg劑量之每日1小時吸入持續14天(第3-5組)或1 mg/kg IV接著在16天清除期之後20 mg/kg單吸入劑量之交叉單劑量(第6組)之後，在食蟹獼猴中研究抗TSLP Fab1之毒物動態學PK/PD及肺分佈。採集連續血液樣品用於PK/PD，評定總TSLP作為PD標記及免疫原性評定。另外，亦採集肺組織勻漿樣品(終末)及BAL流體樣品(第3-5組終末及PK第6組在靜脈內劑量之前及終末)用於PK、總TSLP及免疫原性(僅對於BAL流體)評定。

#### 結果

在吸入之後血清中抗TSLP Fab1的全身性暴露量低，其中在20 mg/kg吸入劑量下所估計之生物可用率小於1%。1 mg/kg吸入劑量不產生任何可偵測之全身性暴露量且10及20 mg/kg吸入劑量展示可比的抗TSLP Fab1的全身性暴露量。在吸入之後約3小時達到C<sub>max</sub>。與大鼠PK類似，在吸入之後的全身性消除半衰期與IV (約2.3小時)相比較長(約7小時)，表明吸收速率限制之動力學。在給藥14天之後，觀測到血清中之暴露量積聚。與低血清暴露量(圖5)相比，關於終末BAL流體及肺勻漿中抗TSLP Fab1濃度之初步資料高得多且隨著劑量增加而增加(圖6)。

## 實例9：抗TSLP Fab1之結晶學及抗原決定基定位

在此實例中，抗TSLP Fab1在游離狀態或與人類TSLP複合時結晶，且測定相應晶體結構。基於X射線資料之對抗TSLP Fab1結合於人類TSLP之分析提供對人類TSLP上抗TSLP Fab1之抗原決定基的洞察。

### 材料及方法

#### 人類TSLP及抗TSLP Fab1之製備及純化

抗TSLP Fab1係藉由在室溫(RT)下，在具有10 mM DTT之100 mM Tris (pH 7.0)中用21  $\mu$ g番木瓜蛋白酶消化抗TSLP mAb1 (10.6 mg) 2小時來產生。用30  $\mu$ M番木瓜蛋白酶抑制劑E64停止反應。抗TSLP Fab1接著在用20 mM磷酸鈉(pH 7.0)平衡之5 mL Lambda Select管柱上純化。Fab用0.1 M檸檬酸pH 3.0溶離，且所收集之溶離份的pH立即用1:10稀釋之1 M Tris pH 8.5調節。LC-MS分析顯示47107.7 Da之質量觀測值，其使預期胺基酸序列與在Thr228之後裂解且在其胺基端攜有焦麩胺酸殘基之重鏈匹配。對於結晶，藉由使用超濾裝置重複濃縮-稀釋步驟而將緩衝液更換成10 mM Tris-HCl pH 7.4、25 mM NaCl，且樣品最終濃縮成13 mg/ml抗TSLP Fab1。

選殖具有N端六組胺酸標籤(SEQ ID NO: 40)後接PreScission (HRV-3C蛋白酶)裂解位點之人類TSLP (Uniprot條目Q969D9；胺基酸29至159)的構築體且表現於大腸桿菌中作為包涵體。對於再摺疊，使用Avestin®高壓均質機使89.4 g大腸桿菌細胞溶解於具有1 mM EDTA、6 mM MgCl<sub>2</sub>及0.375 M蔗糖之715 ml 50 mM Tris (pH 7.0)中。在與3.7 kU benzonase一起培育30分鐘之後，使用SS-34固定角轉子使溶解物在13,000 rpm下離心30分鐘。將離心塊再懸浮於387 ml具有20 mM EDTA、0.5 M NaCl、2% Triton X-100之100 mM Tris (pH 7.0)中且隨後在13,500 rpm下

離心50分鐘。將離心塊再次再懸浮於387 ml具有20 mM EDTA之100 mM Tris pH 7.0中，在13,500 rpm下離心30分鐘，且重複此洗滌程序四次，產生13 g包涵體。包涵體接著溶解於65 ml具有50 mM乙酸鉀(pH 5.0)、5 mM EDTA及10 mM TCEP之6 M鹽酸胍溶液中。在室溫下培育2小時之後，樣品在20,000 rpm (SS-34固定角轉子)下離心30分鐘。清液層(70 ml)用上文所述之鹽酸胍溶液稀釋至100 ml。藉由在4°C下用10 L具有0.5 M精胺酸鹽酸鹽、5 mM EDTA及1 mM GSH之100 mM Tris (pH 8.25)快速稀釋來進行再摺疊。在稀釋之後，添加0.1 mM 麩胱甘肽二硫化物(GSSG)且在4°C下在緩慢攪拌下培育再摺疊混合物7天。pH接著用乙酸調節至5.1，且添加0.1 mM GSSG以破壞剩餘TCEP。略微混濁的再摺疊溶液藉由Sartobran 0.65/0.45  $\mu\text{m}$ 過濾器囊盒過濾且用Pellicon 10kD交叉流膜濃縮至750 ml。濃縮溶液相對於10 L 50 mM乙酸鈉pH 5.4進行滲析。回收約550 mg再摺疊之TSLP。對最終純化樣品之LC-MS分析證實所有二硫橋鍵形成且顯示94%去Met產物(MW = 16862.8 Da)及6%具有N端甲硫胺酸之蛋白質。為了與抗TSLP Fab1一起結晶，使用未用PreScission蛋白酶裂解N端標籤之再摺疊TSLP樣品。

為了製備TSLP-Fab複合物，將含兩倍莫耳過量之His<sub>6</sub>-PreSc-TSLP蛋白質(揭示為SEQ ID NO: 40之「His<sub>6</sub>」)的具有50 mM NaCl之25 mM Tris (pH 7.4)添加至抗TSLP Fab1中，藉由超濾濃縮樣品至約10 mg/ml，裝載於SPX-75尺寸排阻層析管柱上且在具有25 mM NaCl之10 mM Tris-HCl pH 7.4中等度溶離。峰值溶離份藉由超濾濃縮至9.2 mg/ml且提交進行結晶篩選。

### 結晶及X射線資料收集



晶體藉由沉滴式蒸汽擴散而在96孔盤(Innovadyne SD2盤)中生長。詳言之，0.2  $\mu$ l蛋白質儲備液與0.2  $\mu$ l儲液槽溶液混合，且液滴在20°C下相對於80  $\mu$ l相同儲液槽溶液平衡。使用Phoenix機器人系統(Art Robbins Instruments)建立實驗，儲存於RockImager hotel (Formulatrix)中且自動成像。

對於X射線資料收集，將一種晶體直接安置於低溫環中且急驟冷卻至液氮中。在具有Pilatus像素偵測器之Swiss Light Source beamline X10SA，使用1.00001Å X射線照射收集X射線資料集。在兩種情況下，在345 mm之晶體至偵測器距離下記錄每0.25°振盪720個影像且用XDS版本 Dec. 6, 2010, (Kabsch 1993, J Appl Crystallogr; 26:795-800)處理，如在APRV中所實施。

### 結構測定及分析

使用抗CD132抗體Fab片段之晶體結構作為起始模型，藉由使用程式 Phaser (McCoy等人, 2007, J Appl Crystallogr 40:658-674)之分子置換來確定抗TSLP Fab1之結構。抗CD132抗體Fab係基於與抗TSLP Fab1之序列相似性來選擇。使用可變域及第一恆定域作為獨立的搜尋模型以允許Fab彎角之可變性。使用模型構建之疊代循環，接著使用程式Coot 0.8.0 (Crystallographic Object-Oriented Toolkit; Emsley等人, 2010, Acta Crystallogr Sect D: Biol Crystallogr; 66:486-501)及Autobuster 2.11.5 (Bricogne等人, 2011, BUSTER版本2.11.2. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.)進行自動化結晶優化來優化結構。

使用與另一抗體之Fab片段複合的先前內部確定之游離抗TSLP Fab1及人類TSLP的優化結構，藉由使用程式Phaser之分子置換來確定

TSLP-Fab複合物之結構。同樣，使用抗TSLP Fab1之可變域及第一恆定域作為獨立的搜尋模型。如先前關於游離Fab所述，使用Coot 0.8.0及Autobuster 2.11.5優化結構。

使用程式Coot (Emsley等人, 2010, Acta Crystallogr Sect D: Biol Crystallogr; 66:486-501)及PyMOL (分子圖形系統; DeLano Scientific: Palo Alto, CA)進行晶體結構之目視檢查。使用程式Coot及PROCHECK v3.3 (Laskowski等人, 1992, J Appl Crystallogr; 26:283-291)評定最終優化模型之品質。在與抗TSLP Fab1結合後變得不太可接近溶劑之人類TSLP的殘基藉由CCP4程式套件(Collaborative Computational Project, 第4號, 1994)之程式AREAIMOL來鑑別。分子間接觸使用4.0Å之截止距離來定義且使用CCP4程式NCONT來鑑別。

## 結果

### *抗TSLP Fab1之晶體結構*

游離抗TSLP Fab1及其與人類TSLP之複合物藉由在19°C下之沉滴式蒸汽擴散方法而在96孔盤中結晶。令人關注的是，兩種蛋白質樣品在相同結晶條件下結晶：0.17M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、85 mM乙酸鈉pH 5.6、25.5% PEG MME 2000、15%甘油。晶體在4-5週之後出現且在數天內生長至完整尺寸。

游離Fab晶體呈斜方晶空間群P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>，其中每一不對稱單元一個Fab分子。Fab-TSLP複合物之晶體呈空間群I222，其中每一不對稱單元一個複合物(表3)。兩種晶體經繞射達到高解析度，且可自其中之每一者收集具有良好品質及高度冗餘之完整繞射資料集(表3)。

使用先前確定之人類TSLP結構藉由分子置換進行結構測定。使用autobuster優化得到良好的優化統計資料及總體幾何結構(表3)。兩個抗體

殘基Asp50L及Asp152L為游離Fab結構中之拉馬錢德蘭離群值 (Ramachandran outlier)。除此兩個殘基以外，第三抗體殘基Tyr103H亦為Fab-TSLP複合物結構中之拉馬錢德蘭離群值。此三個殘基具有明確界定之電子密度且因此為真正的幾何結構離群值。值得重視的是，Asp50L及Tyr103H為如下所述之TSLP結合中所涉及的CDR殘基。

抗TSLP Fab1重鏈及輕鏈之胺基酸序列提供於圖1A及圖1B，其中CDR加下劃線(如Kabat, 1991, Sequences of proteins of immunological interest, NIH公開號91-3242所定義)且位於抗體-抗原介面之殘基經\*標記。

表3 X射線資料收集及優化統計資料

	游離抗TSLP Fab1	Fab1與人類TSLP之複合物
資料收集		
空間群	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	I222
a, b, c (Å)	69.05, 72.33, 113.58	77.68, 78.46, 233.23
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00
解析度(Å)	1.85 (1.90-1.85)*	2.00 (2.05-2.00)*
R <sub>對稱</sub> 或R <sub>合併</sub>	0.044 (1.108)	0.071 (1.83)
I / $\sigma$ (I)	21.4 (1.42)	16.6 (1.14)
完整率(%)	99.9 (99.8)	99.9 (99.9)
冗餘	6.6 (6.2)	6.6 (6.4)
優化		
解析度(Å)	37.00-1.85	40.00-2.00
反射數	49,249	48,502
R <sub>工作</sub> / R <sub>游離</sub>	0.201 / 0.222	0.194 / 0.214
原子數		
蛋白質	3,245	4,042
硫酸根離子	0	3x5
水	213	195
B因子(Å <sup>2</sup> )		
Fab輕鏈(鏈L)	45.7	52.4
Fab重鏈(鏈H)	48.3	48.5
TSLP (鏈T)	-	98.5
水(鏈W)	51.4	53.1
均方根偏差		
鍵長(Å) / 角度(°)	0.009 / 1.05	0.010 / 1.07
注意：(*)括號中之數值對應於高解析度殼。		

### 與人類TSLP複合之抗TSLP Fab1的晶體結構

此實例中所用之重組人類TSLP的胺基酸序列(SEQ ID NO: 38)提供於圖2中。成熟人類TSLP始於Tyr29。此處所用之構築體具有N端六組胺酸標籤(SEQ ID NO: 40) (殘基15-20)，接著為HRV-3C蛋白酶(PreScission)識別位點(殘基21-28)及由選殖產生之殘基11-14。Asn64及Asn119為潛在的N-連接糖基化位點；且殘基127-130構成潛在的弗林蛋白酶裂解位點(RRKR，SEQ ID NO: 39)。二級結構要素展示在胺基酸序列下方：方塊表示 $\alpha$ -螺旋A、B、C及D，且粗線表示環區。

TSLP未顯現與細胞激素IL-2超家族之其他成員的任何顯著胺基酸序列相似性。然而，TSLP以如同IL-2、IL-7及許多其他細胞激素一般的上-上-下-下拓撲結構摺疊為四螺旋束(圖7)。螺旋 $\alpha_A$ 具有靠近其中心、圍繞Thr46位置之強扭結。螺旋 $\alpha_B$ 及 $\alpha_C$ 相當短，僅各自具有三個轉角；且C端螺旋 $\alpha_D$ 較長，具有幾乎五個轉角(圖7)。三個二硫化物(Cys34-Cys110、Cys69-Cys75、Cys90-Cys137)穩定此短鏈四螺旋束。然而， $\alpha_A$ 與 $\alpha_B$ 及 $\alpha_C$ 與 $\alpha_D$ 之間的兩個交叉連接大部分無序且未見於此晶體結構中。來自 $\alpha_B$ - $\alpha_C$ 環之三個胺基酸及最後五個羧基末端殘基亦在最終優化結構中缺失。潛在的弗林蛋白酶裂解位點及N-糖基化位點位於缺失連接內。

Fab-TSLP複合物之三維結構的總體視圖展示於圖7中。

抗TSLP Fab1主要結合於TSLP之螺旋 $\alpha_A$ ，其經由在一側由H-CDR1及H-CDR2內襯且在另一側由H-CDR3及L-CDR3內襯之淺凹槽來運作。螺旋 $\alpha_A$ 之明顯扭結佔據凹槽之中心部分。側接螺旋 $\alpha_C$ 及 $\alpha_D$ 以及 $\alpha_A$ - $\alpha_B$ 環之前四個殘基提供與抗體之額外交觸。

Fab-TSLP複合物之形成埋藏大致 $1700\text{\AA}^2$ 的經組合之溶劑可及表面，

其中25個Fab胺基酸殘基及25個TSLP胺基酸殘基在複合物形成後經歷其溶劑可及表面之減少。其中，當使用4.0Å距離截止時，20個Fab殘基及16個TSLP殘基(參見表4)涉及直接分子間接觸。形狀互補性統計Sc (Lawrence及Colman, 1993, J Mol Biol; 234:946-50)等於0.72，其為抗體-蛋白質複合物之相對較高值(Sundberg及Mariuzza, 2003, Adv Protein Chem; 61:119-60)。抗TSLP Fab1之所有六個CDR有助於結合於TSLP。此外，位於抗體-抗原介面處之六個明確界定之水介導結合相互作用。

表4. 抗原決定基及互補位殘基

TSLP抗原決定基		抗TSLP Fab1互補位	
結構要素	接觸殘基	接觸殘基	結構要素
$\alpha_A$	Lys38	Thr28H	H-CDR1
	Ala41	Tyr32H	H-CDR1
	Leu44	Tyr103H, Ile102H, Tyr48L	H-CDR3, L-CDR2
	Ser45	Asp31H, Tyr32H	H-CDR1
	Thr46	Asp56H	H-CDR2
	Ser48	Tyr103H	H-CDR3
	Lys49	Trp33H, Glu101H, Tyr103H, Tyr104H, Tyr105H	H-CDR1, H-CDR3
	Ile52	Tyr103H, Tyr104H, Tyr31L, Trp92L	H-CDR3, L-CDR1, L-CDR3
	Thr53	Trp92L	L-CDR3
$\alpha_A - \alpha_B$ 環	Ser56	Trp92L	L-CDR3
	Gly57	Trp92L	L-CDR3
	Thr58	Trp92L	L-CDR3
	Lys59	Gly28L, Ser29L, Lys30L, Tyr31L, Asp50L, Asn65L	L-CDR1, L-CDR2, L-FR3
$\alpha_C$	Lys101	Asp56H	H-CDR2
$\alpha_D$	Gln145	Tyr103H, Tyr31L	H-CDR3, L-CDR1
	Arg149	Asn51L, Glu52L	L-CDR2

直接接觸之抗原決定基及互補位殘基的清單來源於藉由CCP4程式NCONT使用4.0Å距離截止最終優化之座標。

位於結合介面處之TSLP殘基係藉由在複合物形成後計算(i)非氫原子之間小於4.0Å之分子間接觸及(ii)溶劑可及表面之減少而自結晶學座標鑑別。結果以圖形方式展示於圖8中，且TSLP抗原決定基之抗體視圖提供於圖9中。如由此兩個圖可見，螺旋 $\alpha_A$ 連同 $\alpha_A - \alpha_B$ 環之前四個殘基一起形成抗

原決定基之核心，且提供分子間接觸總數及TSLP上埋藏之溶劑可及表面的82%。此外，絕大部分關鍵抗原決定基殘基在此區中發現：Lys49、Ile52、Gly57及Lys59。相比而言，螺旋 $\alpha_C$ 及 $\alpha_D$ 提供極少抗原決定基殘基：Lys101 ( $\alpha_C$ )、Gln145及Arg149 ( $\alpha_D$ )。

抗TSLP Fab1之全部六個互補決定區(CDR)提供結合介面，如由在抗原結合後其溶劑可及表面減少及其對直接分子間接觸之作用所證明(圖10A及圖10B)。另外，輕鏈之第三構架區(L-FR3)的Asn65L亦位於抗原結合介面，但其僅與TSLP之Lys59進行弱(3.6Å) H鍵結之相互作用。

H-CDR3環發揮尤其重要的作用。Glu101H與TSLP之Lys49進行關鍵鹽橋相互作用，且位於環頂端之三個連續酪胺酸Tyr103H、Tyr104H及Tyr105H提供由完整重鏈進行之接觸的58%。H-CDR1之Trp33H及H-CDR2之Asp56H亦為重要的互補位殘基，其分別有助於與TSLP之Lys49及Lys101之結合。

Trp92L為唯一與抗原進行直接接觸之L-CDR3殘基。此殘基位於L-CDR3之頂端且其未採用游離抗TSLP Fab1之晶體結構中所定義之構形。然而，在TSLP複合物中，側鏈具有明確界定之電子密度且與 $\alpha_A$ - $\alpha_B$ 環進行廣泛接觸，其貢獻總計由完整輕鏈進行之接觸的42%。L-CDR2之Asp50L及L-CDR1之Tyr31L為由輕鏈提供之另外兩個重要的互補位殘基。前者與TSLP之Lys59進行極短(2.8Å)的靜電相互作用。後者提供與TSLP之Ile52、Lys59及Gln145的結合相互作用，且亦經由與Tyr103H及Tyr104H之 $\pi$ - $\pi$ 相互作用而穩定H-CDR3環之結合構形。

#### *抗TSLP Fab1之作用模式*

TSLP信號傳導需要組裝包含TSLP、同源TSLPR鏈及共用之IL-7R $\alpha$

鏈的三元複合物。TSLP-TSLPR二元複合物之形成為募集IL-7R $\alpha$ 鏈之前提條件。人類TSLP-Fab1複合物基於所有TSLP C $\alpha$ 原子而疊置於小鼠TSLP-TSLPR-IL-7R $\alpha$ 三元複合物上。結構重疊證明抗TSLP Fab1阻斷TSLP結合於TSLPR及IL-7R $\alpha$ 。TSLP之螺旋 $\alpha_A$ 為抗TSLP Fab1抗原決定基之中心要素(圖11B)，且此螺旋亦在結合於TSLPR及IL-7R $\alpha$ 方面發揮中心作用(圖11A)。另外，螺旋 $\alpha_C$ 參與IL-7R $\alpha$ 結合且螺旋 $\alpha_D$ 為TSLPR結合介面之一部分。由於此兩個螺旋亦提供抗TSLP Fab1抗原決定基，故抗TSLP Fab1與兩個受體鏈之間的空間干擾為廣泛的。抗體輕鏈與TSLPR之D2域廣泛重疊，而重鏈與IL-7R $\alpha$  D2域且亦與D1域之一些細胞激素結合環重疊(圖11C)。資料表明抗TSLP Fab1藉由清除細胞激素且防止其結合於TSLPR受體，由此阻斷與IL-7R $\alpha$ 形成高親和力信號傳導複合物來中和TSLP。

總而言之，確定呈游離狀態或與再摺疊之重組人類TSLP複合之抗TSLP Fab1的高解析度晶體結構。發現抗TSLP Fab1主要結合於人類TSLP之螺旋 $\alpha_A$  (胺基酸殘基Lys 38至Thr 53)，而螺旋 $\alpha_C$  (Lys101)及 $\alpha_D$  (Gln145、Arg149)與 $\alpha_A$ - $\alpha_B$ 環(胺基酸殘基Ser 56至Lys 59)具有極少但重要的作用。人類TSLP與抗TSLP Fab1之複合物結構重疊於公開之具有IL-7RA及TSLPR細胞外域之小鼠TSLP複合物上展示抗TSLP Fab1與IL-7RA及TSLPR競爭結合TSLP。抗TSLP Fab1結合之TSLP無法結合TSLPR且IL7R $\alpha$ 受體之募集亦由於Fab與IL-7 $\alpha$ 受體之間的廣泛位阻而受到抑制。

#### 實例10：抗TSLP Fab1之噴霧乾燥方法及調配物

##### 噴霧乾燥設備及操作

使用定製噴霧乾燥器噴霧乾燥原料。噴霧乾燥器組態包含單噴嘴雙流體霧化器、乾燥腔室、旋風器、轉接器、分離閥及在溫控夾套中之1公升收

集器。在本文所描述之實施例中，噴霧乾燥方法可包括霧化方法、乾燥方法及粒子收集方法。

示例性霧化方法可包括以下步驟：(A1)經調配之原料流體可經由蠕動泵(Watson Marlow)以控制流動速率饋送至安裝於噴霧乾燥器中之單噴嘴空氣輔助霧化器；(A2)將經壓縮之乾燥空氣以控制流動速率饋送至同心收縮氣體噴嘴；及(A3)空氣在噴嘴尖口處膨脹使得原料流體霧化成微細液滴噴霧。

乾燥方法可包括以下步驟：(B1)將用電加熱器加熱之乾燥空氣以設定溫度及控制流動速率饋送至乾燥腔室；(B2)使熱乾燥空氣與步驟A3之微細液滴噴霧相互作用。液滴中之溶劑(水)蒸發，產生固體粒子；及(B3)粒子及溶劑蒸汽/空氣以預定溫度排出乾燥腔室。

粒子收集方法可包括以下步驟：(C1)使步驟B3之粒子及非溶劑蒸汽/空氣以高切向速度進入旋風器；(C2)粒子藉由離心力與空氣混合物分離且在旋風器底部收集於溫控收集容器中；及(C3)排出的非溶劑蒸汽/空氣通過濾膜且排放至分離器內部的氛圍。

### *抗TSLP Fab1之可吸入粉末的製程及調配*

此部分提供用於製備包含用各種賦形劑調配之抗TSLP Fab1粒子之可吸入粉末的調配及噴霧乾燥方法。此涉及噴霧乾燥包含蛋白質(抗TSLP Fab1)及主要充當分散性增強劑(例如三白胺酸)或玻璃形成劑(例如醣類、緩衝鹽)之賦形劑的單相含水原料。原料之pH用組胺酸-HCl緩衝液控制在pH 5.0-pH 5.5之目標pH下。經由應用粒子工程改造原理，選擇賦形劑及組合物以產生包含皺粒子之粉末，皺粒子各具有由改良粉末分散性及保護活性劑之疏水性賦形劑殼圍繞之穩定在玻璃態基質內之蛋白質核心。



表5. 抗TSLP Fab1調配物

批號	抗TSLP Fab1	組胺酸	海藻糖	甘露醇	三白胺酸
	% w/v	% w/v	% w/v	% w/v	% w/v
569-38-01	80	20	0	0	0
569-38-02	90	10	0	0	0
569-38-03	60	10	30	0	0
569-38-04	60	5	20	5	10
569-38-05	40	5	35	0	20
569-38-06	40	5	30	5	20

圖12展示具有較高賦形劑:蛋白質比率之調配物改良抗TSLP Fab1之物理化學穩定性且減小抗TSLP Fab1之聚集率。

#### 包含抗TSLP Fab1之PulmoSol調配物

此部分提供在不同總固體濃度及三白胺酸含量下調配以增加製造產量及使殼形成最佳化之進料的組成。高固體濃度粉末產量。與先前實例相比，在此實例中，TSLP Fab1含量固定在50%，一個除外。

表6. 包含抗TSLP Fab1及三白胺酸之調配物

批號	固體含量	抗TSLP Fab1	組胺酸	三白胺酸	海藻糖	莫耳比
	% w/v	% w/w	% w/w	% w/w	% w/w	糖:藥物
728-06-01	1.5%	50.0%	5.89%	20.0%	24.1%	70.4
728-06-02	2.0%	50.0%	5.89%	15.0%	29.1%	85.0
728-06-03	2.5%	50.0%	5.89%	10.0%	34.1%	99.6
728-06-04	2.0%	50.0%	5.89%	10.0%	34.1%	99.6
728-06-05	1.5%	40.0%	4.71%	20.0%	30.3%	110.6

#### 包含抗TSLP Fab1及15%三白胺酸之調配物

此部分強調經設計以適應三白胺酸之有限水溶解度同時維持原料及所得粒子之可接受之pH的數種調配物。此處，將三白胺酸溶解於HCl水溶液中且使用各種鹼性介質返滴定以達到原料溶液之目標pH (pH 5.0-pH 5.5)。需要大致1:1莫耳比之HCl比三白胺酸以完全溶解三白胺酸。

表7. 包含抗TSLP Fab1及15%三白胺酸之調配物

批號	抗TSLP FAB1	組胺酸	海藻糖	三白胺酸	酸, HCl	鹼
	% w/v	% w/w	% w/w	% w/w	% w/w	% w/w
569-60-01	50.0%	5.64%	26.8%	15.0%	2.56%	N/A

569-60-02	50.0%	5.64%	19.4%	15.0%	2.56%	組胺酸	7.40%
569-60-03	50.0%	5.64%	24.1%	15.0%	2.56%	KOH	2.69%
569-60-04	50.0%	5.64%	26.8%	15.0%	2.56%	NH <sub>4</sub> OH	2.70%

### 實例11：藉由溶液平衡滴定(SET)測定抗TLSP Fab1對人類及獼猴TSLP蛋白質之結合親和力

進行溶液平衡滴定(SET)量測以測定抗TSLP Fab1對人類及獼猴TSLP蛋白質之結合親和力。Fab在恆定濃度下與各別抗原之連續稀釋液一起培育。結合親和力係自藉由相對於所施用之抗原濃度標繪未結合抗體之濃度讀數所產生之競爭曲線推斷出。抗TSLP Fab1對所有人類及獼猴TSLP蛋白質展示低皮莫耳濃度(pM)範圍之結合親和力。

#### 分析程序

製備人類TSLP (在HEK細胞中產生)及獼猴TSLP抗原於樣品緩衝液中之二十二個連續1.6<sup>n</sup>稀釋液且添加恆定濃度之Fab1。60微升/孔體積之各抗原-Fab混合物一式兩份地分佈於384孔聚丙稀微量滴定盤(MTP)。樣品緩衝液充當陰性對照物且僅含有Fab1之樣品充當陽性對照物(Bmax)。將盤密封且在室溫(RT)下在震盪器上培育隔夜(o/n，至少16小時)。

384孔MSD陣列MTP在4°C下用30微升/孔以5 µg/ml稀釋於PBS中之hsTSLP (在大腸桿菌中產生)塗佈隔夜，接著用70微升/孔洗滌緩衝液洗滌三次且在室溫下在震盪器上用50微升/孔阻斷緩衝液阻斷1小時。在洗滌之後，將30微升/孔體積之平衡的抗原-Fab混合物自聚丙稀MTP轉移至經塗佈之MSD盤且在室溫下培育20分鐘。

再在洗滌步驟之後，將30 µl以1.8 µg/ml稀釋於樣品緩衝液中之加碘基標籤之偵測抗體添加至各孔中且在室溫下在震盪器上培育30分鐘。洗滌MSD盤且添加35微升/孔1×MSD讀取緩衝液並在室溫下培育5分鐘。產生ECL信號且藉由MSD Sector Imager 6000量測。

對各抗原進行三次獨立實驗且論證穩定的分析條件。根據此等實驗，如下所示計算解離平衡常數 $K_D$ 之平均值及標準差。

**表8. Fab1結合於人類及獼猴TSLP蛋白質之親和力常數( $K_D$ )**

FAB	抗原	$K_D$ (pM)	實驗數
Fab1	人類TSLP (HEK)	$5.0 \pm 2.0$	3
Fab1	獼猴TSLP	$1.4 \pm 0.6$	3

### 實例12：食蟹獼猴中之兩週吸入劑量範圍探索研究

在此非GLP研究中，目標為在向食蟹獼猴投與時測定Fab1 (抗胸腺基質淋巴生成素(TSLP) Fab)之潛在毒性，投與藉由吸入途徑每日投與一次，持續14天，或在第1天以單次劑量IV注射，隨後13天為非給藥期且在第15天為單次吸入劑量。另外，研究Fab1之藥物動力學/藥力學(PK/PD)曲線及免疫原性(IG)。

以單個研究之兩個單獨組成部分形式來進行研究。

僅吸入：Fab1 PulmoSol粉末(含39.7% Fab1之PulmoSol)藉由吸入以1.0、10.0及20.0毫克Fab1/公斤/天之目標日劑量投與3組(3隻雄性/組)食蟹獼猴。另一組猴(2隻雄性)接受安慰劑PulmoSol粉末且充當對照物。另外單隻雄性動物僅接受空氣且充當空氣對照物。使用旋轉電刷產生器裝置(RBG1000)產生Fab1 PulmoSol氣溶膠及安慰劑PulmoSol氣溶膠。使用緊密配合的口鼻罩使動物暴露於Fab1 PulmoSol粉末(第3至5組)或安慰劑PulmoSol粉末(第2組)之氣溶膠，目標60分鐘，每日一次，持續14天。使用相同的設備設定使第1組單隻雄性動物僅暴露於經過濾的乾燥空氣，持續相同的目標持續時間。向第3、4及5組總共投與之Fab1的平均氣溶膠濃度分別為0.036、0.31及0.66 mg/L。第3、4及5組之總體平均(估計的總)遞送劑量分別為1.1、9.6及19.9毫克Fab1/公斤/天。質量中值空氣動力學直徑(MMAD)證實，所產生之Fab1氣溶膠為猴可吸入的且測試物種將實現可接

受之肺部沈積。

靜脈內/吸入：Fab1在第1天以單次靜脈內快速注射形式經由隱靜脈投與一組3隻雄性動物(第6組)。目標劑量為1毫克Fab1/公斤。接著，使動物具有13天非給藥期，隨後在第15天藉由吸入投與Fab1 PulmoSol粉末(含39.7% Fab1之PulmoSol)。目標劑量為20毫克Fab1/公斤。使用旋轉電刷產生器裝置(RBG1000)產生Fab1 PulmoSol氣溶膠。使用緊密配合的口鼻罩使動物在單個時刻暴露於Fab1 PulmoSol粉末之氣溶膠，目標60分鐘。接著保留動物6天，隨後在第21天安樂死。總共投與之Fab1的平均氣溶膠濃度為0.60 mg/L。總體平均估計的總遞送劑量為16.3毫克Fab1/公斤/天。質量中值空氣動力學直徑(MMAD)證實，所產生之Fab1氣溶膠為猴可吸入的且測試物種將實現可接受之肺部沈積。

在此研究中評估以下參數及端點：臨床症狀、體重、體重變化、臨床病理學參數(血液學、凝血及臨床化學)、Fab1與TSLP濃度及毒理動力學參數之生物分析(血清、支氣管肺泡灌洗術(BAL)流體、肺組織提取物)、抗Fab1抗體(血清及BAL流體)、總體屍檢發現、器官重量及組織病理學檢查(僅第1至5組)。

經由吸入給藥投與Fab1持續14天在雄性食蟹獼猴之鼻腔(增加呼吸道上皮內之黏液細胞)、肺(彌漫性肺泡巨噬細胞積聚、增加細支氣管-肺泡淋巴細胞性及混合肺泡發炎性細胞浸潤)及支氣管淋巴結(增加一般細胞性)內產生明顯變化。此等變化在所有處理組之動物當中顯而易見。在所有情況下，研究結果之嚴重程度為最低程度至輕度且觀測結果未視為不良的。

總體而言，在所有用Fab1處理之動物中，基於血清、支氣管肺泡(BAL)及肺提取物中之濃度資料證明暴露於Fab1；而在來自空氣或安慰劑

PulmoSol對照動物之任何樣品中均未偵測到Fab1。在第15天之吸入劑量之後，生物可用率經計算為大致0.2%。僅在第1天給藥前第4組之一隻動物及在第14天第5組之一隻動物的血清中偵測到抗Fab1抗體，但所觀測到的信號不視為對此等動物暴露於Fab1具有明顯影響。在研究中偵測到總體上對Fab1無明顯免疫原性。除在第一洗滌樣品(在BAL程序期間自三隻經Fab1處理之動物收集)中偵測到一些極低信號以外，在大部分樣品之血清、BAL或肺組織中未偵測到總TSLP。

總之，Fab1在第1天以單次靜脈內快速注射形式投與3隻食蟹獼猴，隨後為13天非給藥期且在第15天以單次吸入劑量形式投與未產生不良效應。向食蟹獼猴吸入投與Fab1持續14天與所有處理組動物之鼻腔、肺及支氣管淋巴結內的明顯變化相關聯。在所有情況下，研究結果之嚴重程度為最低程度至輕度且觀測結果未視為不良的。接受Fab1之所有動物全身性暴露於測試物品。

### 實例13：食蟹獼猴中之十三週吸入毒性研究

此研究之目標為當每日藉由吸入途徑給與食蟹獼猴一次，持續至少92個連續日(13週)時，測定Fab1 (抗胸腺基質淋巴生成素(TSLP) Fab)之潛在毒性，及評估在42天(6週)恢復期之後任何發現的潛在可逆性。另外，測定Fab1之毒理動力學及免疫原性特徵。

Fab1 PulmoSol粉末藉由吸入以3、10及22毫克/公斤/天之目標日劑量投與3組(3隻/性別/組)食蟹獼猴。另一組猴(3隻/性別)接受安慰劑PulmoSol粉末且充當對照物。安慰劑及22毫克/公斤/天組中之額外2隻動物(2隻/性別)在研究中維持6週恢復期。使用旋轉電刷產生器裝置(RBG1000)產生Fab1 PulmoSol氣溶膠及安慰劑PulmoSol氣溶膠。使用緊密配合的口鼻罩

使動物暴露於Fab1 PulmoSol粉末(第2至4組)或安慰劑PulmoSol粉末(第1組)之氣溶膠，目標60分鐘，每日一次，持續至少92個連續日。

在此研究中評估以下參數及端點：臨床症狀、體重、體重變化、眼科檢查、神經檢查(包括呼吸速率)、心電學、臨床病理學參數(血液學、凝血、臨床化學及尿分析)、周邊血液淋巴球免疫表型(流式細胞測量術)、免疫功能(對匙孔血藍蛋白(KLH)之T細胞依賴性抗體反應(TDAR))、Fab1濃度及毒理動力學參數之生物分析(血清及肺組織提取物)、抗Fab1抗體(血清)、總體屍檢發現、器官重量及組織病理學檢查。

向第2、3及4組總共投與之Fab1的平均氣溶膠濃度分別為0.10、0.33及0.72 mg/L。第2、3及4組所估計之總體平均達成之總遞送劑量(性別組合)分別為3.0、10.1及22.2毫克/公斤/天Fab1。質量中值空氣動力學直徑(MMAD)證實，所產生之Fab1氣溶膠為猴可吸入的且測試物種將實現可接受之肺部暴露。

在以所達成之3、10或22毫克/公斤/天之劑量投與Fab1後，未觀測到對心血管參數中之任一者的明顯測試物品相關效應。

免疫功能(TDAR)研究結果指示在所達成之 $\geq 10.1$ 毫克/公斤/天之劑量下朝著抗KLH IgG抗體含量降低之趨勢。在最後一個取樣時間點(研究第78天)，在所達成之 $\geq 3$ 毫克/公斤/天之劑量下注意到抗KLH IgG及IgM抗體含量降低。此效應在雄性中在所有時間點及在雌性中在第78天最明顯，但在其他取樣時刻在雌性中較不顯著。朝著抗KLH反應降低之趨勢不視為不良的。第4組(22.2毫克/公斤/天)恢復動物在所有時刻之抗KLH IgG及IgM抗體含量在與並行對照物(第1組)恢復值相比時較高，且與對照物(第1組)主要研究結果類似，表明降低之抗KLH抗體反應恢復。在所達成之3毫克/公斤/

天之劑量下經由吸入給藥投與Fab1至少92天使得肺內淋巴組織之細胞性增加。在所有情況下，研究結果之嚴重程度為最低程度至輕度且不視為不良的。在6週恢復期之後，在2/4 (50%)之恢復動物中不存在研究結果且在2/4 (50%)之高劑量動物中觀測到處於最低嚴重程度。相同研究結果亦存在於一隻對照恢復雌性動物中(輕度)，證實此變化可能偶爾在對照動物當中偶發地發現。在安慰劑PulmoSol對照組(第1組)動物之血清或肺組織樣品中之任一者中未偵測到Fab1。總體而言，用Fab1處理之動物在整個給藥期顯示暴露於Fab1，而在血清及肺組織中均具有劑量相關之增加。在第92天之最後一次劑量後，在至多14-28天的恢復期間亦顯示血清中之全身性暴露，而在所有恢復動物中截至在135天(在最後一次劑量後的42天)屍檢時，肺組織濃度為不可偵測的。在所有劑量組之重複日劑量之後，暴露於Fab1之血清自研究第1天至研究第91天存在顯著積聚。未觀測到暴露量之明顯性別相關差異。在兩隻安慰劑PulmoSol對照動物中在給藥前基線及給藥後時間點均觀測到低但是可偵測的抗藥物抗體(ADA)信號，其可能歸因於預先存在不特異性針對Fab1之抗體。在任何其他對照動物中未偵測到ADA信號。所有經Fab1處理之動物早在研究第28天前即出現給藥後ADA信號。三隻動物之強ADA信號表面上與血清中Fab1之暴露損失相關聯，但此等動物在屍檢時(在最後一次劑量後1~6小時)仍顯示肺暴露於Fab1。總之，在至多22.2毫克/公斤/天可吸入達成之劑量下向食蟹獼猴吸入投與Fab1持續13週具有良好耐受性。已證實所有接受Fab1之動物具有Fab1之全身性及肺暴露。抗Fab1抗體早在第28天前即存在於所有經處理動物中且與3隻個體中之暴露量比其餘經處理動物低得多相關聯。微觀評估證實所有經Fab1處理之動物中之大部分的肺淋巴組織的細胞性增加，其在6週恢復期之後在50%高劑量

恢復動物中觀測到。在所有情況下，研究結果之嚴重程度為最低程度至輕度且不視為不良的。

#### 實例14：單株抗體片段之簡單噴霧乾燥調配物的製備

本文所述之單株抗體片段Fab1之分子量為46.6 kDa。已描述乾燥粉末調配物用於局部肺遞送以治療哮喘。在此上下文中，使用術語「簡單」係指調配物僅具有活性醫藥成分(Fab1)及緩衝劑。

一系列包含89.5%活性醫藥成分及10.5%組胺酸緩衝劑之簡單抗體調配物由包含各種乙醇/水溶劑組合物之進料製造(表9)。乙醇含量在5%與20% w/w之間變化。進料在NSD噴霧乾燥器上噴霧乾燥，其中入口溫度為105°C，出口溫度為70°C，乾燥氣體流動速率為595 L/min，霧化器氣體流動速率為20 L/min，液體進料速率為8.0 mL/min且ALR為 $2.5 \times 10^3$  v/v。固體含量固定在2% w/v下。

表9. 方法參數對於包含89.5% API於組胺酸緩衝劑中之簡單抗體調配物的微晶粒學特性的影響。

批號	API (%w/w)	三白胺酸 (% w/w)	固體 (%w/v)	EtOH (% w/w)	PPSD ( $\mu\text{m}$ )			敲緊密度 ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )
					x10	x50	x90	
761-22-07	89.5	0	2	0	0.55	1.34	3.24	0.347
761-02-09	89.5	0	2	5	0.66	1.93	5.64	0.178
761-02-06	89.5	0	2	10	0.73	2.48	7.19	0.142
761-02-07	89.5	0	2	20	0.69	1.94	6.04	0.135

#### 實例15：抗體之簡單噴霧乾燥調配物的微晶粒學特性

實例14之噴霧乾燥抗體調配物的微晶粒學特性呈現在表9中。所有僅包含API及緩衝劑之簡單調配物產生具有光滑粒子表面(亦即，無表面波紋)之粒子。添加少量乙醇至含水原料降低粉末之容積密度及敲緊密度(胰島素調配物亦觀測到)。粒子亦在其初始粒度分佈(PPSD)方面相對較大。

#### 實例16：抗體之簡單噴霧乾燥調配物的氣溶膠效能



針對實例15中敘述之粉末所測定之DD及TLD呈現在表10中。初始粒子計算所得的中值空氣動力學直徑 $D_a$ 在0.71與0.93  $\mu\text{m}$ 之間(使用以下等式自敲緊密度及x50量測值計算所得： $d_a = d_g \sqrt{\rho_p}$ )。

Concept1乾燥粉末吸入器為基於低阻力囊盒之裝置( $R = 0.07 \text{ cm H}_2\text{O}^{1/2} / (\text{L}/\text{min})$ )。

表10. 簡單抗體調配物之氣溶膠效能。氣溶膠效能係使用Concept1吸入器(20 mg填充質量)在90 L/min之流動速率及2 L之總體積下評定(n=5)。

批號	敲緊密度 ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	x50 ( $\mu\text{m}$ )	$D_a$ (計算) ( $\mu\text{m}$ )	形態	DD (% ND)	TLD (% DD)
761-22-07	0.347	1.34	0.79	光滑	64.9	65.0
761-02-09	0.178	1.93	0.81	光滑	77.0	57.1
761-02-06	0.142	2.48	0.93	光滑	81.2	43.7
761-02-07	0.135	1.94	0.71	光滑	74.3	57.7

由表10中之資料清楚可知，僅降低密度不足以能夠形成有效避免在口腔-咽喉中沈積之粒子。為此，粒子形態必須經修飾以增加表面皺度(波紋)且初始粒度降低將為合乎需要的。

令人關注的是，應注意，雖然肽及小蛋白質在不存在殼形成賦形劑之情況下天然採用波紋形態，但抗體之調配物需要添加殼形成賦形劑以能夠形成波紋粒子。在此方面，殼形成賦形劑及乙醇之添加在修飾壁厚及噴霧乾燥粒子之密度方面發揮類似的作用。因此，在殼形成劑存在下，添加乙醇之影響較小。

#### 實例17：抗體之平台噴霧乾燥調配物的製備及微晶粒學特性

在此系列噴霧乾燥粉末中，噴霧乾燥條件保持恆定，且評定添加殼形成賦形劑(亦即，三白胺酸，0-15% w/w)對抗體調配物之影響。此等調配物亦含有作為玻璃形成劑之海藻糖(約29-44% w/w，視三白胺酸含量而定)及組胺酸緩衝劑(5.9% w/w，pH 5.0)。

粉末在定製NSD噴霧乾燥器上噴霧乾燥，其中入口溫度為105°C，出口溫度為70°C，乾燥氣流速率為595 L/min，霧化器氣體流動速率為25 L/min，液體進料速率為10.0 mL/min，且ALR為 $2.5 \times 10^3$  v/v。固體含量在2% w/w下保持恆定。所有粉末具有波紋形態，批次761-02-12除外，其在不存在殼形成劑之情況下噴霧乾燥且產生與實例16中所觀測到的粒子類似的光滑粒子。結果展示於表11中。在一些實施例中，本發明之乾燥粉末調配物包含核殼粒子，該等核殼粒子包含：殼形成賦形劑及包含API、玻璃形成賦形劑及緩衝劑之核心，有時在本文中亦稱為平台調配物。

表11. 方法參數對於包含50.0% w/w API、5.9%組胺酸緩衝劑、海藻糖及三白胺酸之『平台』抗體調配物的微晶粒學特性的影響。

批號	API (%w/w)	三白胺酸 (% w/w)	EtOH (% w/w)	PPSD ( $\mu\text{m}$ )			敲緊密度 ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )
				x10	x50	x90	
728-06-04	50.0	10.0	0	0.55	2.28	5.14	0.366
728-06-02	50.0	15.0	0	0.64	2.06	4.83	0.197
761-02-12	50.0	0.0	10	0.48	1.60	4.87	0.158
761-22-06	50.0	5.0	10	0.50	1.63	3.85	0.268
761-02-11	50.0	10.0	10	0.63	2.25	5.75	0.176
761-02-10	50.0	15.0	10	0.67	2.30	5.27	0.112

實例18：具有不同三白胺酸含量之抗體之『平台』噴霧乾燥調配物的氣溶膠效能

針對實例17中所述之粉末所測定之DD及TLD呈現在表12中。

表12. 方法參數對於平台抗體調配物之微晶粒學特性及氣溶膠效能的影響。氣溶膠效能係使用Concept1吸入器(20毫克填充質量)在90 L/min之流動速率及2 L之總體積下評定(n=5)。

批號	乙醇/ 固體	敲緊密度 ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	x50 ( $\mu\text{m}$ )	$D_a$ (計算) ( $\mu\text{m}$ )	形態	DD (% ND)	TLD (% DD)
728-06-04	0	0.366	2.28	1.38	波紋	90.0	83.3
728-06-02	0	0.197	2.06	0.91	波紋	90.0	80.0
761-02-12	5	0.158	1.60	0.64	光滑	69.0	66.2
761-22-06	5	0.268	1.63	0.84	波紋	89.2	79.1

761-02-11	5	0.176	2.25	0.94	波紋	92.3	84.8
761-02-10	5	0.112	2.30	0.77	波紋	93.1	83.0

具有波紋粒子形態之抗體調配物觀測到DD及TLD之顯著改良。在本發明之實施例中，所需波紋形態由粒子表面上存在殼形成賦形劑三白胺酸而產生。

在本發明之實施例中，粒子表面上之材料的物理化學特性影響粒子形態。對於大蛋白質(諸如大於20,000道爾頓之某些蛋白質)，為了達成所需形態，諸如三白胺酸之殼形成賦形劑為較佳的。在本發明之實施例中，形成調配物及組合物之粒子具有波紋形態以減小粒子之間的內聚力，使得聚結物之尺寸足夠小以便聚結物可被吸入。

當添加乙醇時，其藉由減小壁厚而降低(另外)波紋粒子之粒子密度。此繼而降低敲緊密度，使得較小初始粒子能夠符合所需空氣動力學特性。在一些實施例中，粒子的密度應降低，以使得初始粒子及聚結物可被吸入。

當乙醇含量自0%增加至10% w/w時，注意到配對的調配物728-06-04與761-02-11及728-06-02與761-02-10之敲緊密度顯著減小。對於此實例中之特定調配物，僅添加10%乙醇未獲得氣溶膠效能優於由殼形成賦形劑提供之氣溶膠效能的目標改良。TLD為極好的(>80%之DD)，但仍低於90% w/w之DD的所需目標，大部分因為粒子太大且太密集。對於波紋粒子，計算所得的初始空氣動力學直徑 $D_a$ 範圍介於0.77至1.38  $\mu\text{m}$ 。

**實例19：經修飾之方法參數(固體含量及共溶劑添加)對於平台抗體調配物之微晶粒學特性的影響**

調配物包含50.0% w/w API、5.9% w/w組胺酸緩衝劑(pH 5.0)、約14% w/w或29% w/w海藻糖及15% w/w或30% w/w三白胺酸。粉末在定製NSD噴霧乾燥器上噴霧乾燥，其中入口溫度為105°C，出口溫度為70°C，乾燥

氣體流動速率為595 L/min，霧化器氣體流動速率為30 L/min，液體進料速率為4.0 mL/min且ALR為 $7.5 \times 10^3$  v/v。固體含量減小至1% w/w。噴霧乾燥方法中之此等修飾經設計以減小初始粒度。在本發明之實施例中，觀測到初始粒度分佈之顯著減小。

表13. 方法參數對於包含50.0% w/w API、5.9%組胺酸緩衝劑、海藻糖及三白胺酸之『平台』抗體調配物之微晶粒學特性的影響。

批號	API (%w/w)	固體 (%w/v)	三白胺酸 (% w/w)	EtOH (% w/w)	PPSD ( $\mu\text{m}$ )			敲緊密度 ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )
					x10	x50	x90	
761-22-01	50.0	1.0	15.0	5	0.39	1.33	2.59	0.282
761-22-02	50.0	1.0	15.0	10	0.51	1.31	2.59	0.232
761-22-03	50.0	1.0	15.0	20	0.53	1.36	2.94	0.151
761-02-04	50.0	1.0	15.0	30	0.55	1.44	3.15	0.162
761-22-05	50.0	1.0	30.0	20	0.64	1.58	2.94	0.122

實例20：經修飾之方法參數(固體含量及共溶劑添加)對於平台抗體調配物之氣溶膠效能的影響

固體含量減小及ALR增加對於平台抗體調配物之氣溶膠效能的影響呈現在表14中。觀測到初始粒子之中值空氣動力學直徑相對於實例18中之粒子顯著減小。此翻譯成TLD在約94%與98%之DD之間，亦即在效能之所需、較佳或最佳目標範圍內。

表14. 方法參數對於平台抗體調配物之微晶粒學特性及氣溶膠效能的影響。氣溶膠效能係使用Concept1吸入器(20 mg填充質量)在90 L/min之流動速率及2 L之總體積下評定(n=5)。

批號	乙醇/ 固體	敲緊密度 ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	x50 ( $\mu\text{m}$ )	形態	$D_a$ (計算) ( $\mu\text{m}$ )	DD (% ND)	TLD (% DD)
761-22-01	5	0.282	1.33	波紋	0.71	92.4	97.8
761-22-02	10	0.232	1.31	波紋	0.63	93.9	95.1
761-22-03	20	0.151	1.36	波紋	0.53	92.1	95.6
761-02-04	30	0.162	1.44	波紋	0.58	93.7	95.0
761-22-05	20	0.122	1.58	波紋	0.55	95.0	93.7

除非另外定義，否則本文所用之技術及科學術語均具有與其由熟悉本

發明所屬領域之專家通常所理解相同的含義。

如熟習此項技術者應清楚，除非另外指明，否則所有未特定詳細描述之方法、步驟、技術及操作可以本身已知之方式進行且已以本身已知之方式進行。例如再次參考標準手冊及本文中提及之一般背景技術及其中所引用之其他參考文獻。

除非另外指明，否則本文中所引用之參考文獻各以全文引用的方式併入本文中。

本發明之申請專利範圍為非限制性的且提供於下文中。

雖然本文已詳細揭示特定態樣及申請專利範圍，但此已藉助於實例僅僅出於說明之目的進行，且不意欲對所附申請專利範圍之範疇或任何對應將來申請案之申請專利範圍之標的物範疇具有限制性。詳言之，本發明人預期在不背離如申請專利範圍所界定之本發明之精神及範疇下可對本發明進行各種取代、改變及修改。咸信核酸起始物質、所關注之純系或文庫類型的選擇對於具有本文中描述之態樣之知識的一般技術者而言為慣例。認為其他態樣、優點及修改在以下申請專利範圍之範疇內。熟習此項技術者應僅僅使用常規實驗即可識別或能夠確定本文中所述之本發明的特定態樣的許多等效物。此類等效物意欲由以下申請專利範圍所涵蓋。在後來申請之對應申請案中申請專利範圍範疇的改寫可歸因於各國家之專利法律的限制且不應解釋為放棄申請專利範圍之標的物。

## 【序列表】

<110> 瑞士商諾華公司

<120> 胸腺基質淋巴生成素(TSLP)-結合分子及該分子之使用方法

<130>

<140>

<141>

<150> 62/342,511

<151> 2016-05-27

<150> 62/216,050

<151> 2015-09-09

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met His  
1 5 10

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 2

His Ile Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro  
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 3

Glu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ser  
1 5

<210> 4  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 4  
 Asp Tyr Trp Met His  
 1 5

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 5  
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 1 5

<210> 6  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 6  
 Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr  
 1 5

<210> 7  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 7  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly His Ile Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala  
 50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 8  
<211> 360  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 8  
gaggttcagc tgggtggaatc aggcggcggga ctggttaagc ctggcggtag ccttagactt 60  
agctgcgctg ctagtggcct caccittagc gactactgga tgcactgggt tagacaggcc 120  
cctggtaaag gcttggagtg ggtcggacac attaagtcta agaccgacgc cggcactacc 180  
gactacgccg ctcccgttaa gggccgggtc actatctcta gggacgactc taagaacacc 240  
ctctacctic aaatgaatag ccttaagacc gaggacaccg ccgttacta ctgcgctaga 300  
gaaatctact actacgcctt cgatagctgg ggcaaggca ccctcgtgac cgtgtctagc 360

<210> 9  
<211> 450  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 9  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly His Ile Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala  
50 55 60



Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Ala Arg Glu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220  
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 260 265 270  
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys  
 450

<210> 10  
 <211> 1350  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 10  
 gaggttcagc tgggtggaatc aggcggcgga ctggtaagc ctggcggtag ccttagactt 60  
 agctgcgctg ctagtggctt cacctttagc gactactgga tgcactgggt tagacaggcc 120  
 cctggtaaag gcttggagtg ggtcggacac attaatgcta agaccgacgc cggcactacc 180  
 gactacgccg ctcccgttaa gggccggttc actatctcta gggacgactc taagaacacc 240  
 ctctaccttc aaatgaatag ccttaagacc gaggacaccg ccgtctacta ctgcgctaga 300  
 gaaatctact actacgccit cgatagctgg ggtcaaggca ccctcgtgac cgtgtctagc 360  
 gctagcacta agggcccaag tgtgtttccc ctggcccca gcagcaagtc tacttccggc 420  
 ggaactgctg ccttgggttg cctgggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gacagtgtcc 480  
 tggaaactctg gggctctgac ttccggcgig cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc 540  
 ggccigtaca gcctgagcag cgtggtgaca gtgccctcca gctctctggg aaccagacc 600  
 tatactgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660  
 aagagctgcg acaagaccca cacctgcccc cctgcccag ctccagaact gctgggaggg 720

```

ccttccgtgt tectgttccc cccaagccc aaggacacc tgatgatcag caggaccccc 780
gaggtgacct gcgtggtggt ggacgtgtcc cacgaggacc cagaggtgaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
agcacctaca gggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 960
gaatacaagt gcaaagtctc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaaa gacaatcagc 1020
aaggccaagg gccagccacg ggagccccag gtgtacacc tgcacccag ccgggaggag 1080
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctacc cagcgatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagt 1200
ctggacagcg acggcagctt ctctctgtac agcaagctga ccgtggacaa gtccaggtg 1260
cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
cagaagtccc tgagcctgag ccccggaag 1350

```

<210> 11  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 11  
Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr Val His  
1 5 10

<210> 12  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 12  
Gly Asp Asn Glu Arg Pro Ser  
1 5

<210> 13  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 13  
Gln Ala Ala Asp Trp Val Asp Phe Tyr Val  
1 5 10

<210> 14  
<211> 7

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 14  
Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr  
1 5

<210> 15  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 15  
Gly Asp Asn  
1

<210> 16  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 16  
Ala Asp Trp Val Asp Phe Tyr  
1 5

<210> 17  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 17  
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Leu Ser Val Ser Val Ala Leu Gly Gln  
1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr Val  
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45

Gly Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly



Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala  
 100 105 110

Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala  
 115 120 125

Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala  
 130 135 140

Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val  
 145 150 155 160

Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser  
 165 170 175

Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr  
 180 185 190

Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala  
 195 200 205

Pro Thr Glu Cys Ser  
 210

<210> 20  
 <211> 639  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 20  
 agctacgagc tgactcagcc ccttagcggt agcgtggccc tgggtcaaac cgctagaatc 60  
 acctgtageg gcgataatat cggctctaaa tacgttcaact ggtatcagca gaagcccgtt 120  
 caagcccccg tgctcgtgat ctacggcgat aacgagcggc ctagcgggat ccccgagcgg 180  
 tttagcggct ctaatagcgg taacaccgct accctgacta tctctagggc tcaggccggc 240  
 gacgaggccg actactactg tcaggccgcc gactgggtgg acttctacgt gttcggcggg 300  
 ggactaagc tgaccgtgct ggggtcaacct aaggetgccc ccagcgtgac cctgttcccc 360  
 cccagcagcg aggagctgca ggccaacaag gccaccctgg tgtgcctgat cagcgacttc 420  
 taccagcggc ccgtgaccgt ggccctggaag gccgacagca gccccgtgaa ggccggcgtg 480  
 gagaccacca cccccagcaa gcagagcaac aacaagtacg ccgccagcag ctacctgagc 540  
 ctgacccccg agcagtggaa gagccacagg tctacagct gccaggigac ccacgagggc 600  
 agcaccgtgg aaaagaccgt ggcccccaacc gagtgcagc 639

<210> 21

<211> 360  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 21  
 gaggtgcagc tgggtgaatc aggcggcgga ctggtcaagc ctggcggtag cctgagactg 60  
 agctgcgctg ctagtggctt caccttttagc gactactgga tgcactgggt cagacaggcc 120  
 cctggtaaag gcctggagtg ggtcggacac attaatgcta agaccgacgc cggcactacc 180  
 gactacgccg ctctctgtaa gggccggttc actatctcta gggacgactc taagaacacc 240  
 ctgtacctgc agatgaatag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtctacta ctgcgctaga 300  
 gagatctact actacgcctt cgatagctgg ggtcagggca ccctggtcac cgtgtctagc 360

<210> 22  
 <211> 223  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 22  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly His Ile Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala  
 50 55 60  
 Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Ala Arg Glu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys  
210 215 220

<210> 23  
<211> 669  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 23  
gaggtgcagc tgggtggaatc aggcggcgga ctggtcaagc ctggcggtag cctgagactg 60  
agctgcgctg ctagtggctt caccttttagc gactactgga tgcactgggt cagacaggcc 120  
cctggtaaag gcctggagtg ggtcggacac attaatgcta agaccgacgc cggcactacc 180  
gactacgccg ctctgtgaa gggccggttc actatctcta gggacgactc taagaacacc 240  
ctgtacctgc agatgaatag cctgaaaacc gaggacaccg ccgttacta ctgcgctaga 300  
gagatctact actacgcctt cgatagctgg ggtcagggca ccctggtcac cgtgtctagc 360  
gctagcacta agggcccctc cgtgttcct ctggcccctt ccagcaagtc tacctctggc 420  
ggcaccgctg ctctgggctg cctgggtgaag gactacttcc ctgagcctgt gacagtgtcc 480  
tggaaactctg ggcacctgac ctccggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcagtcctcc 540  
ggcctgtact cctgtctc cgtgggtgaca gtgccttctt ccagcctggg caccagacc 600  
tatatctgca acgtgaacca caagccttcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggagcct 660  
aagtcatgc 669

<210> 24  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 24  
agctacgagc tgactcagcc cctgagcgtc agcgtggccc tgggtcagac cgctagaatc 60



acctgtagcg gcgataaiat cggctctaaa tacgtgcaact ggtatcagca gaagcccggg 120  
caggcccccg tgcctggtgat ctacggcgat aacgagcggc ctacgggaat ccccgagcgg 180  
tttagcggct ctaatagcgg taacaccgct accctgacta tctctagggc tcaggccggc 240  
gacgaggccg actactactg tcaggccgcc gactgggtgg acttctacgt gttcggcgga 300  
ggcactaagc tgaccgtgct g 321

<210> 25  
<211> 213  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 25  
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Leu Ser Val Ser Val Ala Leu Gly Gln  
1 5 10 15  
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr Val  
20 25 30  
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
35 40 45  
Gly Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60  
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly  
65 70 75 80  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Ala Asp Trp Val Asp Phe Tyr  
85 90 95  
Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala  
100 105 110  
Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala  
115 120 125  
Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala  
130 135 140  
Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val  
145 150 155 160  
Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser  
165 170 175  
Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr

180

185

190

Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala  
 195 200 205

Pro Thr Glu Cys Ser  
 210

<210> 26  
 <211> 639  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 26  
 agctacgagc tgactcagcc cctgagcgtc agcgtggccc tgggtcagac cgctagaatc 60  
 acctgtagcg gcgataatat cggctctaaa tacgtgcaact ggtatcagca gaagcccggc 120  
 caggcccccg tgctggatgat ctacggcgat aacgagcggc ctagcggaat ccccgagcgg 180  
 tttagcggct ctaatagcgg taacaccgct accctgacta tctctaggc tcaggccggc 240  
 gacgaggccg actactactg tcaggccgcc gactgggtgg acttctacgt gttcggcggg 300  
 ggcactaagc tgaccgtgct gggtcagcct aaggctgccc ccagcgtgac cctgttcccc 360  
 cccagcagcg aggagctgca ggccaacaag gccaccctgg tgtgcctgat cagcgacttc 420  
 taccagggcg ccgtagcgtt ggccctggaag gccgacagca gccccgtgaa ggccggcgtg 480  
 gagaccacca cccccagcaa gcagagcaac aacaagtacg ccgccagcag ctacctgagc 540  
 ctgacccccg agcagtggaag gagccacagg tcctacagct gccaggtgac ccacgagggc 600  
 agcaccgtgg aaaagaccgt ggcccccaacc gagtgcagc 639

<210> 27  
 <211> 159  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 27  
 Met Phe Pro Phe Ala Leu Leu Tyr Val Leu Ser Val Ser Phe Arg Lys  
 1 5 10 15

Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asp Phe Thr  
 20 25 30

Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Thr Ile Ser  
 35 40 45

Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser Thr Glu Phe Asn  
 50 55 60

Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu Thr Glu Ile Gln



taaatatagt gaagcaattt gaaataattt tcaagcaaag tattgtgaaa gtattctaag 1200  
 ccaagtttta aatattatct aacagacaag agtggatat acaagtagat cctgagaagt 1260  
 acctttgtta cagctaciat aaatatacat ataaattata gaatctactt taatttattt 1320  
 tgtgaacact ttgaaaatg tacatgttcc ttigttaattg aactatata tttcttaata 1380  
 aaataattct caaatttggt tcttatgaat catcttcaa atctagttag acaatttgca 1440  
 cacatacttt tctaagggac attatcttcc ttcaggtttt tacctccact catccttaga 1500  
 gccactgac tgcctccctt tatacctggt ggccctgcct ataggagaga atatttgag 1560  
 ataggcagct tcaggatgca ttgcaatcat ccttttctta aattatgca ctagtctttt 1620  
 attttttccc ctcttgaact ttcttcacac ctggaagaaa caaagtagga aaaagtgaac 1680  
 aggggatgic aaatcgattc ttgaattccc gctgcaagct agagccgcag gcaccctctc 1740  
 actcaatttc cactcagaac cctataaaca ccagtgggaa gggcaacca ctgcacgtgg 1800  
 gaatgcactg atttttctta ggagtagaca tgttctctta attactccct gagggttagt 1860  
 tggggctaaa ccatgacaga agtggggaag ttcaatgtcc ttaaatecat ctacttgcc 1920  
 aacaggttaag aggaagctta cattacatgt ccagtccaca tttaaagagc acttactgtg 1980  
 gaacaagcct tcagcctaac aatggggata gaaaagtagg taagactcag cctttgtcca 2040  
 gagaagctca gggtatagct gaataggcag tttcttttgt cctgaggaaa atcaggacat 2100  
 gcctgctttc taaaaatctt cctctgaaga cctgaccaa gctcttaaat gctattgtaa 2160  
 gagaaatttc ttgtctatt aactccattt tagtaggat tcaactgacta gattttactg 2220  
 aactatgaaa ataaatacac ataattttc acaaaatttt gggcccaatt ccctaaaag 2280  
 aatgaggat tagggagaaa ggagacaact caaagtcac ccattaagtg cagtttcttt 2340  
 gaatctctg ctttactttt aaaaatttgt ataattata tattttatc tatgtgttcc 2400  
 atagatatct taatgtaaaa ttagtcattt aaattacact gtcaattaaa agtaatgggc 2460  
 aagagattgc atcactactaa ttagtaaga acgttcccaa atgttgtaac aatgtggatc 2520  
 atacatctct ggttttttaa atgtattgag gcttcttgg tggactagta tagtatacgg 2580  
 tcagttatgt caatgtttca tggtaataa aaaggaagtt gcaattgt 2629

<210> 29  
 <211> 63  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 29  
 Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly  
 1 5 10 15

Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Arg Arg  
 20 25 30

Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu  
 35 40 45

Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln  
 50 55 60

<210> 30  
 <211> 2411  
 <212> DNA  
 <213> 智人

<400> 30  
 accctcgcca cgccccctgct cccccgcggt tggttcttcc ttgctctact caaccctgac 60  
 ctcttctctc tgactctcga cttgtgttcc cgcctctcc ctgaccttcc tcccctcccc 120  
 ttctactcaa ttctaccaa ctctttctct ctctgggtgtt ttctctttt ctcgtaaact 180  
 ttgccgccta tgagcagcca cattgcctta ctgaaatcca gagcctaacc ttcaatccca 240  
 ccgccggctg cgcgtcgcct gccaaagaaa tgttcgccat gaaaactaag gctgccttag 300  
 ctatctgggtg cccaggctat tcggaaactc agataaatgc tactcaggca atgaagaaga 360  
 ggagaaaaag gaaagtcaca accaataaat gtctggaaca agtgtcaca ttacaaggat 420  
 tgtggcgtcg cttcaatcga cctttactga aacaacagta aacctcttt attatggta 480  
 tatttcacag caccaaaata aatcatcttt attaagtaga tgaacatta actctaactg 540  
 tgacaaagaa gaccacaaat agttatcttt taattacaga agagtttctt aacttacttt 600  
 tgtaagtttt tattgtgtaa gtttataatg caggggaagt actactcctc aaatgttgag 660  
 ggaagcttcc ataacattga tgactggctt catggcagta attctcggct gtagttgcat 720  
 aagcattgct caagaggaaa atccaaaagt gcagcaggag aactcttttc cctgaaaaag 780  
 gaaaaatatt gaactcaatg atagcaccta aacttacatt taaaagacag acattccttc 840  
 tacatgtaat gacacttctt gtgttaaact aaaaatttac aagagaagaa agtgaaagca 900  
 aatggggttt cacaaatagt tglaaatata gtgaagcaat ttgaaataat tttcaagcaa 960  
 agtattgtga aagtattcta agccaagttt taaatattat ctaacagaca agagtggat 1020  
 atacaagtag atcctgagaa gtaccttigt tacagctact ataaatatac atataaatta 1080  
 tagaatctac ttttaattat ttigtgaaca cttttgaaaa tgtacatgtt cctttgtaat 1140  
 tgacactata tatttcttaa taaaataatt ctcaaattg tttcttatga atcatctctc 1200  
 aaatctagtt agacaatttg cacacatact tttctaaggg acattatctt ccttcaggtt 1260  
 tttacctcca ctcatcctta gagcccactg actgctcccc tttatactg ttggccctgc 1320  
 ctataggaga gaatatttgg agataggcag cttcaggatg cattgcaatc atccttttct 1380  
 taaattatgt cactagtctt ttatttttcc cctcttgaa ctttctcac acctggaaga 1440  
 aacaaagtag gaaaaagtga acaggggatg tcaaatcga tcttgaattc ccgctgcaag 1500  
 ctagagccgc aggcaccctc tcaactcaatt tccactcaga accctataaa caccagtggg 1560  
 aagggaacc cactgcacgt gggaatgcac tgatttttcc taggagtaga catgttctc 1620  
 taattactcc ctgagggtta gttgggcta aacctgaca gaagtgggga agttcaatgt 1680

ccttaaatcc atcttacttg ccaacaggta agaggaagct tacattacat gtccagtcca 1740  
 catttaaaga gcacttactg tggacaagc cttcagccaa acaatgggga tagaaaagta 1800  
 ggtaagactc agcctttgtc cagagaagct cagggtatag ctgaataggc agtttctttt 1860  
 gtccfgagga aatcaggac atgcctgctt tctaaaaac ttcctctgaa gacctgaccc 1920  
 aagctcttaa atgctattgt aagagaaatt tctttgteta ttaactccat tttagtaggg 1980  
 attcactgac tagatnttac tgaactatga aaataaac acataatntt tcacaaaatt 2040  
 ttgggcccac tccccctaaa agaattgagg attagggaga aaggagacaa ctcaaagtca 2100  
 tcccattaag tgcagtttct ttgaatcttc tgcittatct ttaaaaattt gtataattta 2160  
 tatattttat tctatgtgtt ccatagatat cttaatgtaa aattagtcac ttaaattaca 2220  
 ctgtcaatta aaagtaatgg gcaagagatt gcatcact aatttagtaa gaacgttccc 2280  
 aatgttgta acaatgtgga tcatacatct ctggtttttt aatgtattg aggccttctt 2340  
 ggtggactag tatagtatac ggtcagttat gtcaatgttt catggtcaat aaaaaggaag 2400  
 ttgcaaattg t 2411

<210> 31  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> 食蟹獼猴

<400> 31

Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Glu Ala Asp Tyr Leu  
 1 5 10 15

Arg Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser  
 20 25 30

Thr Asp Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu  
 35 40 45

Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Pro Arg Cys Ala Ser  
 50 55 60

Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Arg Lys Thr Lys Ala Thr Leu Ala Leu  
 65 70 75 80

Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met  
 85 90 95

Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln  
 100 105 110

Val Ser Gln Leu Leu Gly Leu Trp Arg Arg Phe Ile Arg Thr Leu Leu  
 115 120 125

Lys Lys Gln

130

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 393

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 食蟹獼猴

&lt;400&gt; 32

```

tacgacttca ccaactgcga cttcgagaag atcgaggccg actacctgag aaccatcagc      60
aaggacctga tcacctacat gagcggcacc aagagcaccg acttcaacaa caccgtgtcc      120
tgcagcaaca gaccccaactg cctgaccgag atccagagcc tgaccttcaa ccccaccccc      180
agatgtgcca gctctggccaa agagatgttc gccagaaaga ccaaggccac cctggccctg      240
tggigtcccg gctacagcga gacacagatc aacgccacac aggccatgaa gaagcggcgg      300
aagcggaaag tgaccaccaa caagtgcctg gaacaggtgt cacagctgct ggggctgtgg      360
cggcggttca tccggaccct gctgaagaag cag                                     393

```

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 140

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;400&gt; 33

```

Met Val Leu Leu Arg Ser Leu Phe Ile Leu Gln Val Leu Val Arg Met
1           5           10           15

```

```

Gly Leu Thr Tyr Asn Phe Ser Asn Cys Asn Phe Thr Ser Ile Thr Lys
                20           25           30

```

```

Ile Tyr Cys Asn Ile Ile Phe His Asp Leu Thr Gly Asp Leu Lys Gly
        35           40           45

```

```

Ala Lys Phe Glu Gln Ile Glu Asp Cys Glu Ser Lys Pro Ala Cys Leu
        50           55           60

```

```

Leu Lys Ile Glu Tyr Tyr Thr Leu Asn Pro Ile Pro Gly Cys Pro Ser
65           70           75           80

```

```

Leu Pro Asp Lys Thr Phe Ala Arg Arg Thr Arg Glu Ala Leu Asn Asp
            85           90           95

```

```

His Cys Pro Gly Tyr Pro Glu Thr Glu Arg Asn Asp Gly Thr Gln Glu
        100           105           110

```

```

Met Ala Gln Glu Val Gln Asn Ile Cys Leu Asn Gln Thr Ser Gln Ile
        115           120           125

```

```

Leu Arg Leu Trp Tyr Ser Phe Met Gln Ser Pro Glu
        130           135           140

```

&lt;210&gt; 34

<211> 1143  
 <212> DNA  
 <213> 小家鼠

<400> 34

```

cacgttcagg cgacagcatg gttcttctca ggagcctctt catcctgcaa gtactagtag      60
ggatggggct aactfacaac ttttctaact gcaacttcac gtcaattacg aaaatatatt      120
gtaacataat ttttcatgac ctgactggag atttgaaagg ggctaagttc gagcaaatcg      180
aggactgtga gagcaagcca gcttgtctcc tgaaaatcga gfactatact ctcaatccta      240
tccctggctg cccffcactc cccgacaaaa catttgcccg gagaacaaga gaagccctca      300
atgaccactg cccaggctac cctgaaactg agagaaatga cggctactcag gaaatggcac      360
aagaagtcca aaacatctgc ctgaatcaaa cctcacaat tctaagattg tggatttcct      420
tcatgcaatc tccagaataa aattagcttt cagcttctgc tatgaaaatc tctatcttgg      480
ttttagtgga cagaatacta aggggtgtgac acttagagga ccactgggtg ttattcttta      540
attacagaag ggattcttaa cttatttttt ggcatatcgc tttttcagt ataggtgctt      600
taaatgggaa atgagcaata gaccgttaat ggaaatatct gtactgttaa tgaccagctt      660
ctgagaagtc tttctacct cccctgcaca caccttactc tagggcaaac ctaactgtag      720
taggaagaga attgaaagta gaaaaaaaa attaaaacca atgacagcat ctaaaccctg      780
tttaaaaggc aaggattttt ctacctgtaa tgattcttct aacattccta tgctaagatt      840
ttaccaaaaga aaaaaatgac agttcgggca gtcactgcca tgatgagggt gtctgaaaga      900
agatttgiga atctgggaga aactgctgag atcatattgc aaatccagct gtcaaagggt      960
tcagaccagc gacagtacaa ttctgagca gatctcaaga gccttcgaca tctacgagat     1020
atatatftaa agttgtagat aatgaatttc taatttattt tgtgagcact tttggaaata     1080
tacatgctac tttgtaatga atacatttct gaataaagta attctcaagt ttgaaaaaaaa     1140
aaa                                                                                   1143

```

<210> 35  
 <211> 1146  
 <212> DNA  
 <213> 小家鼠

<400> 35

```

actcttgcca ggcacctccc tctgtgggt tgattccgtt ttctcttct caactgactc      60
tggattctga taccagacac ctctctggtg tctttccctc ctatcccat ccccttccct     120
gtccctttca ttcaattttt aatatctggc gggttttttt tttttttct ctctctctga     180
actgtgccgc ttgtgagcag ccagcttgtc tctgaaaaat cgagtactat actctcaatc     240
ctatccctgg ctgcccttca ctccccgaca aaacatttgc cgggagaaca agagaagccc     300
tcaatgacca ctgcccaggc taccctgaaa ctgagagaaa tgacggtact caggaaatgg     360
cacaagaagt ccaaaacatc tgccatgaa aaacctcaca aattctaaga ttgtgtatt      420
ccttcatgca atctccagaa taaaattagc tttcagcttc tgctatgaaa atctctatct     480

```



tggttttagt ggacagaata ctaaggggtgt gacacttaga ggaccactgg tgtttattct 540  
 ttaattacag aagggattct taacttattt ttggcatat cgcttttttc agtataggtg 600  
 ctttaaatgg gaaatgagca atagaccgft aatggaaata tctgtactgt taatgaccag 660  
 cttctgagaa gtctttctca cctcccctgc acacacctta ctctagggca aacctaactg 720  
 tagtaggaag agaattgaaa gtagaaaaaa aaaattaata ccaatgacag catctaaacc 780  
 ctgtttaaaa ggcaaggatt tttctacctg taatgattct tctaaccatt ctatgctaag 840  
 attttaccaa agaagaaaat gacagttcgg gcagtcactg ccatgatgag gtggtctgaa 900  
 agaagattgt ggaatctggg agaaactgct gagatcatat tgcaaatcca gctgtcaaag 960  
 ggttcagacc caggacagta caattcgtga gcagatctca agagccttgc acatctacga 1020  
 gatatatatt taaagttgta gataatgaat ttctaattta ttttgtgagc acttttggaa 1080  
 atatacatgc tactttgtaa tgaatacatt tctgaataaa gtaattctca agtttggaaa 1140  
 aaaaaa 1146

<210> 36  
 <211> 136  
 <212> PRT  
 <213> 褐家鼠

<400> 36  
 Met Val Leu Phe Arg Tyr Leu Phe Ile Leu Gln Val Val Arg Leu Ala  
 1 5 10 15

Leu Thr Tyr Asn Phe Ser Asn Cys Asn Phe Glu Met Ile Leu Arg Ile  
 20 25 30

Tyr His Ala Thr Ile Phe Arg Asp Leu Leu Lys Asp Leu Asn Gly Ile  
 35 40 45

Leu Phe Asp Gln Ile Glu Asp Cys Asp Ser Arg Thr Ala Cys Leu Leu  
 50 55 60

Lys Ile Asp His His Thr Phe Asn Pro Val Pro Gly Cys Pro Ser Leu  
 65 70 75 80

Pro Glu Lys Ala Phe Ala Leu Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ile Asn Tyr  
 85 90 95

Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Glu Arg Asn Gly Thr Leu Glu Met Thr  
 100 105 110

Arg Glu Ile Arg Asn Ile Cys Leu Asn Gln Thr Ser Gln Ile Leu Gly  
 115 120 125

Leu Trp Leu Ser Cys Ile Gln Ser  
 130 135

<210> 37  
 <211> 1125  
 <212> DNA  
 <213> 褐家鼠

<400> 37  
 tcaggcaaca gcatggttct tttcaggtac ctctttatcc tgcaagtggt acggctggca 60  
 ctaacttaca acttttctaa ctgtaacttc gagatgattt tgagaatata tcatgcaaca 120  
 atttttcgtg acctgcttaa agatttgaat gggatcttgt tgcaccaaat cgaggactgt 180  
 gacagcagga cagcttgtct cctgaaaatc gaccaccata ccttcaatcc tgtccctggc 240  
 tgcccgtcac tccccgagaa agcgttcgct ttgaaaacga aagcggccct cattaactac 300  
 tgcccaggct actctgaaac tgagagaaat ggtactctgg aaatgacacg agaaatcaga 360  
 aacatctgcc tgaatcaaac ctcaaaaatt ctaggattgt ggctttcctg cattcaatct 420  
 tgaagaaaaa attagctttt ggattatatt atgaaaatat atatcttgtt tttagtagat 480  
 ataatactaa ggggtgtgaca cttaaaagaa cactaatgtt tattctttaa ttatagaagg 540  
 gattcttaac ttatttttgg catatcgttg tttagtgtag gcgctttaa tggaaaatga 600  
 gcattacccc tttaatggaa ataaccgtgc tgtaaatgat tggcttcggc ttctgagcag 660  
 tctttctcac ctacactgag acactttact ctagggcaaa cctaactgta gtaggaagaa 720  
 aatcaaaagt agaaaaacag ttgaaaccaa tgacaggatc tatactccat ttaaaaggca 780  
 agaatttttg tacctgtaat gattcttcta acattcctac gctaagattt tactaaagaa 840  
 gaaaataaca gcagaggaaa gigttcaggc agtcaactgcc atgatgaagc tgcagaatc 900  
 tgagagctac tgctgcaact gatcgtgtag taaatccagc tgtaaagggg atcttaacc 960  
 accacagtgg gatgcacagg cagatcccca agggcattgt gcagctgtga gatatatatt 1020  
 taaagttgta tataatgatt ttctaattta ttccgtgagc accttgaaa atatacatgt 1080  
 cgctgtgtaa caaatacact tctgaataaa gtaattctca agttc 1125

<210> 38  
 <211> 149  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 38  
 Met Gly Ser Ser His His His His His His Leu Glu Val Leu Phe Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Pro Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala  
 20 25 30  
 Tyr Leu Ser Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr  
 35 40 45

Lys Ser Thr Glu Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His  
 50 55 60

Cys Leu Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys  
 65 70 75 80

Ala Ser Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu  
 85 90 95

Ala Ile Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln  
 100 105 110

Ala Met Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu  
 115 120 125

Glu Gln Val Ser Gln Leu Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro  
 130 135 140

Leu Leu Lys Gln Gln  
 145

<210> 39  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 未知物

<220>  
 <223> 未知物之描述：潛在弗林蛋白酶裂解位點

<400> 39  
 Arg Arg Lys Arg  
 1

<210> 40  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成6×His標籤

<400> 40  
 His His His His His His  
 1 5

<210> 41  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 41

Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu  
 1 5 10 15

Ser Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser  
 20 25 30

Thr Glu Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu  
 35 40 45

Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser  
 50 55 60

Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile  
 65 70 75 80

Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met  
 85 90 95

Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln  
 100 105 110

Val Ser Gln Leu Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu  
 115 120 125

Lys Gln Gln  
 130

<210> 42  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 42  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr  
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly His Ile Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala  
 50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr  
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85

90

95

Tyr Cys Ala Arg Glu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 115

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 109

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列之描述：合成多肽

&lt;400&gt; 43

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Leu Ser Val Ser Val Ala Leu Gly Gln  
 1 5 10 15

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr Val  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45

Gly Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly  
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Ala Asp Trp Val Asp Phe Tyr  
 85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln  
 100 105

## 【發明申請專利範圍】

### 【第1項】

一種特異性結合人類胸腺基質淋巴生成素(TSLP)之抗體或抗體片段，其選自以下中之任一者：

a) 包含以下之抗體或抗體片段：

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 4之重鏈互補決定區1 (HCDR1)；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 2之重鏈互補決定區2 (HCDR2)；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 3之重鏈互補決定區3 (HCDR3)；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 11之輕鏈互補決定區1 (LCDR1)；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 12之輕鏈互補決定區2 (LCDR2)；及

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 13之輕鏈互補決定區3 (LCDR3)；

b) 包含以下之抗體或抗體片段：

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 5之HCDR1；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 6之HCDR2；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 3之HCDR3；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 14之LCDR1；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 15之LCDR2；及

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 16之LCDR3；及

c) 包含以下之抗體或抗體片段：

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 1之HCDR1；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 2之HCDR2；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 3之HCDR3；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 11之LCDR1；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 12之LCDR2；及  
包含胺基酸序列SEQ ID NO: 13之LCDR3。

**【第2項】**

如請求項1之抗體或抗體片段，其包含：

重鏈可變區，該重鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO: 7，及  
輕鏈可變區，該輕鏈可變區包含胺基酸序列SEQ ID NO: 17。

**【第3項】**

如請求項1之抗體或抗體片段，其包含：

重鏈，該重鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO: 22，及  
輕鏈，該輕鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO: 25。

**【第4項】**

如請求項1之抗體或抗體片段，其包含：

重鏈，該重鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO: 9，及  
輕鏈，該輕鏈包含胺基酸序列SEQ ID NO: 19。

**【第5項】**

如請求項1至4中任一項之抗體或抗體片段，其中該抗體或抗體片段係單株抗體或其片段。

**【第6項】**

如請求項1至4中任一項之抗體或抗體片段，其中該抗體片段選自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、微型抗體(minibody)或雙功能抗體(diabody)。

**【第7項】**

如請求項1至4中任一項之抗體或抗體片段，其中該抗體片段為Fab。

**【第8項】**

如請求項7之抗體或抗體片段，其中該抗體或抗體片段為人類或人類化Fab。

**【第9項】**

如請求項1至4中任一項之抗體或抗體片段，其中該抗體或抗體片段為人類免疫球蛋白或其片段。

**【第10項】**

如請求項1至4中任一項之抗體或抗體片段，其中該抗體或抗體片段以小於100 pM之解離常數( $K_D$ )結合人類TSLP。

**【第11項】**

如請求項1至4中任一項之抗體或抗體片段，其中該抗體或抗體片段以小於10 pM之解離常數( $K_D$ )結合人類TSLP。

**【第12項】**

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至11中任一項之抗體或抗體片段及至少一種醫藥學上可接受之賦形劑。

**【第13項】**

如請求項12之醫藥組合物，其中該抗體或抗體片段佔該組合物之5%至95% (w/w)。

**【第14項】**

如請求項12之醫藥組合物，其中該抗體或抗體片段佔該組合物之10%至90% (w/w)。

**【第15項】**

如請求項12之醫藥組合物，其中該抗體或抗體片段佔該組合物之20%至80% (w/w)。



**【第16項】**

如請求項12之醫藥組合物，其中該抗體或抗體片段佔該組合物之25%至75% (w/w)。

**【第17項】**

如請求項12之醫藥組合物，其中該抗體或抗體片段佔該組合物之40%至60% (w/w)。

**【第18項】**

如請求項12至17中任一項之醫藥組合物，其中該組合物包含殼形成劑。

**【第19項】**

如請求項18之醫藥組合物，其中該殼形成劑為三白胺酸或白胺酸。

**【第20項】**

如請求項19之醫藥組合物，其中該三白胺酸或白胺酸為該組合物之10-75% (w/w)。

**【第21項】**

如請求項20之醫藥組合物，其中該三白胺酸佔該組合物之10-30% (w/w)，或其中該白胺酸佔該組合物之50-75% (w/w)。

**【第22項】**

如請求項12至17中任一項之醫藥組合物，其中該組合物包含至少一種玻璃形成賦形劑。

**【第23項】**

如請求項22之醫藥組合物，其中該至少一種玻璃形成賦形劑係選自組胺酸、海藻糖、甘露醇、蔗糖或檸檬酸鈉。

**【第24項】**

如請求項23之醫藥組合物，其中該至少一種玻璃形成賦形劑係選自海藻糖或海藻糖與甘露醇之混合物。

**【第25項】**

如請求項22之醫藥組合物，其中該玻璃形成賦形劑為該組合物之15-35% (w/w)。

**【第26項】**

如請求項12至17中任一項之醫藥組合物，其中該組合物包含緩衝劑。

**【第27項】**

如請求項26之醫藥組合物，其中該緩衝劑係選自組胺酸、甘胺酸、乙酸鹽或磷酸鹽緩衝劑。

**【第28項】**

如請求項26之醫藥組合物，其中該緩衝劑為該組合物之5-13%。

**【第29項】**

如請求項12至17中任一項之醫藥組合物，其中該組合物係調配為乾燥粉末調配物。

**【第30項】**

如請求項29之醫藥組合物，其中該組合物係調配為適於吸入之乾燥粉末調配物。

**【第31項】**

如請求項12之醫藥組合物，其中該組合物包含：包含殼及核心之噴霧乾燥粒子，其中該殼包含三白胺酸或白胺酸，且該核心包含：

i) 該抗體或抗體片段、海藻糖、甘露醇及緩衝劑；或

ii) 該抗體或抗體片段、海藻糖、緩衝劑及HCl。

**【第32項】**

如請求項31之醫藥組合物，其中該緩衝劑係選自組胺酸、甘胺酸、乙  
酸鹽或磷酸鹽緩衝劑。

**【第33項】**

一種包含噴霧乾燥粒子之醫藥組合物，該等噴霧乾燥粒子包含：

i) 包含海藻糖、甘露醇、組胺酸及TSLP結合分子之核心，或包含海  
藻糖、組胺酸、HCl及TSLP結合分子之核心，其中該TSLP結合分子為抗  
體Fab，其包含：

a) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 4之HCDR1；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 2之HCDR2；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 3之HCDR3；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 11之LCDR1；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 12之LCDR2；及

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 13之LCDR3；或

b) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 5之HCDR1；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 6之HCDR2；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 3之HCDR3；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 14之LCDR1；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 15之LCDR2；及

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 16之LCDR3；或

c) 包含胺基酸序列SEQ ID NO: 1之HCDR1；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 2之HCDR2；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 3之HCDR3；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 11之LCDR1；

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 12之LCDR2；及

包含胺基酸序列SEQ ID NO: 13之LCDR3；及

ii) 包含三白胺酸或白胺酸之殼。

#### 【第34項】

如請求項33之醫藥組合物，其包含：

a) 40% (w/w) TSLP結合分子、25% (w/w)三白胺酸、30% (w/w)組合重量之海藻糖與甘露醇，及5% (w/w)組胺酸；

b) 50% (w/w) TSLP結合分子、15% (w/w)三白胺酸、2.6% (w/w) HCl、5.6% (w/w)組胺酸，及26.8% (w/w)組合重量之海藻糖與鹼；或

c) 50% (w/w) TSLP結合分子、15% (w/w)三白胺酸、19.4% (w/w)海藻糖、13.04% (w/w)組胺酸及2.56% (w/w) HCl。

#### 【第35項】

一種套組，其包含如請求項1至11中任一項之抗體或抗體片段及用於向個體遞送該抗體或抗體片段之裝置。

#### 【第36項】

如請求項35之套組，其中該裝置遞送呈氣溶膠化形式之該抗體或抗體片段。

#### 【第37項】

一種套組，其包含如請求項12至34中任一項之醫藥組合物及用於向個體遞送該醫藥組合物之裝置。

#### 【第38項】

如請求項37之套組，其中該裝置遞送呈氣溶膠化形式之該醫藥組合物。

**【第39項】**

如請求項35或37之套組，其中該裝置為乾燥粉末吸入器。

**【第40項】**

如請求項1至4中任一項之抗體或抗體片段，其用於治療有需要個體之TSLP相關病狀。

**【第41項】**

如請求項12至17中任一項之醫藥組合物，其用於治療有需要個體之TSLP相關病狀。

**【第42項】**

一種如請求項1至11中任一項之抗體或抗體片段的用途，其用於製造用於治療有需要個體之TSLP相關病狀的藥物。

**【第43項】**

一種如請求項12至34中任一項之醫藥組合物的用途，其用於製造用於治療有需要個體之TSLP相關病狀的藥物。

**【第44項】**

如請求項42或43之用途，其中該TSLP相關發炎病狀係選自哮喘、慢性阻塞性肺病、過敏性鼻炎、過敏性鼻竇炎、過敏性結膜炎、嗜伊紅血球性食道炎及異位性皮膚炎。

**【第45項】**

如請求項42或43之用途，其中該TSLP相關發炎病狀為哮喘。

**【第46項】**

如請求項42或43之用途，其中該抗體或抗體片段係調配為適於吸入之乾燥粉末調配物。

**【第47項】**

如請求項42或43之用途，其中該抗體或抗體片段係經口或鼻內投與該個體。

**【第48項】**

如請求項42或43之用途，其中該抗體或抗體片段係以氣溶膠化形式投與該個體。

**【第49項】**

如請求項42或43之用途，其中該抗體或抗體片段係藉由乾燥粉末吸入器投與該個體。

**【第50項】**

如請求項42或43之用途，其中該個體為人類。

**【第51項】**

如請求項42或43之用途，其中該藥物進一步包含第二藥劑或與第二藥劑併用。

**【第52項】**

如請求項51之用途，其中該第二藥劑係選自由以下組成之群：皮質類固醇、支氣管擴張劑、抗組織胺、抗白三烯及PDE-4抑制劑。

**【第53項】**

一種核酸，其編碼如請求項1至11中任一項之抗體或抗體片段或其片段。

**【第54項】**

如請求項53之核酸，其包含：

第9頁(發明申請專利範圍)

- a) SEQ ID NO: 8 ;
- b) SEQ ID NO: 18 ;
- c) SEQ ID NO: 8及SEQ ID NO: 18 ;
- d) SEQ ID NO: 10 ;
- e) SEQ ID NO: 20 ;
- f) SEQ ID NO: 10及SEQ ID NO: 20 ;
- g) SEQ ID NO: 21 ;
- h) SEQ ID NO: 24 ;
- i) SEQ ID NO: 21及SEQ ID NO: 24 ;
- j) SEQ ID NO: 23 ;
- k) SEQ ID NO: 26 ; 或
- l) SEQ ID NO: 23及SEQ ID NO: 26 。

**【第55項】**

一種載體，其包含如請求項53至54中任一項之核酸。

**【第56項】**

一種宿主細胞，其包含如請求項53至54中任一項之核酸。

**【第57項】**

一種宿主細胞，其包含如請求項55之載體。

**【第58項】**

一種產生如請求項1至11中任一項之抗體或抗體片段的方法，該方法包含：

培養表現編碼該抗體或抗體片段之核酸的宿主細胞；及

自培養基收集該抗體或抗體片段。

**【第59項】**

一種用於製造包含如請求項1至11中任一項之抗體或抗體片段之乾燥粉末調配物的方法，該方法包含：

(a) 提供包含如請求項1至11中任一項之抗體或抗體片段、三白胺酸或白胺酸、玻璃形成賦形劑及緩衝劑之水溶液；

(b) 在120°C至200°C(入口)範圍及55°C至75°C(出口)範圍之溫度噴霧乾燥步驟(a)之水溶液以產生乾燥粉末粒子；及

(c) 收集該等乾燥粉末粒子。

**【第60項】**

如請求項59之方法，其中該緩衝劑係選自組胺酸、甘胺酸、乙酸鹽或磷酸鹽緩衝劑。

**【第61項】**

如請求項59至60中任一項之方法，其中該玻璃形成賦形劑係選自組胺酸、組胺酸鹽酸鹽(histidine hydrochloride salt)、海藻糖、甘露醇、蔗糖或檸檬酸鈉。

**【第62項】**

如請求項12之醫藥組合物，其中賦形劑:抗體或抗體片段質量比大於0.5。



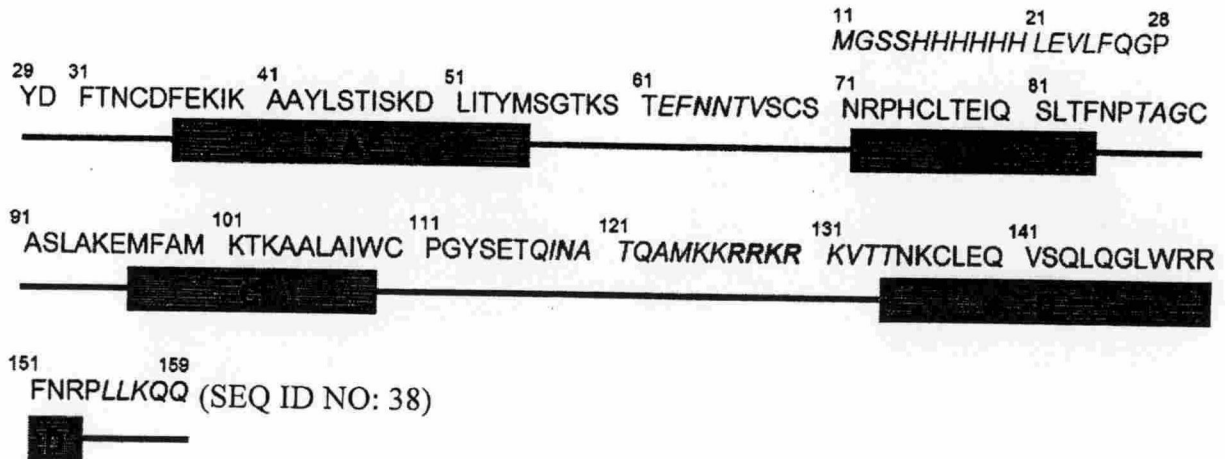
【發明圖式】

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYWMHWVRQAPGKGLEWVGHIKSKTDAGTTDYAAPVK  
 GRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAREIYYAFDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS  
 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY  
 ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC (SEQ ID NO: 22)

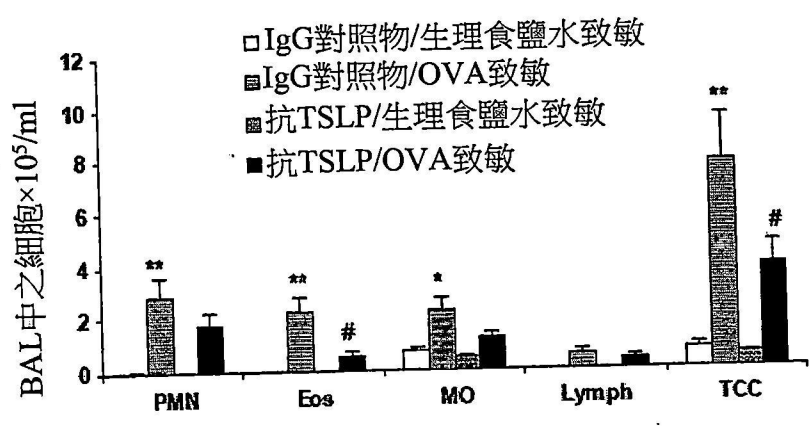
【圖1A】

SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYVHWYQQKPGQAPVLIYGDNERPSGIPERFSGSNSGNTATLTIS  
 RAQAGDEADYYCQAADWVDFYVFGGGTKLTVLQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWK  
 ADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 25)

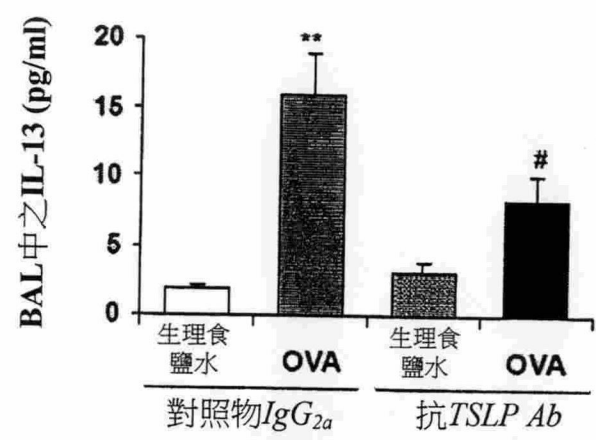
【圖1B】



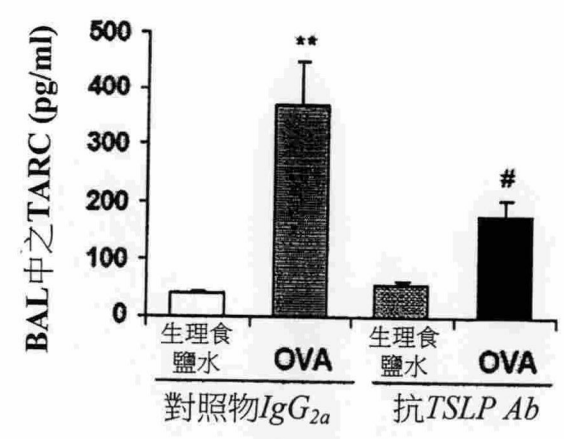
【圖2】



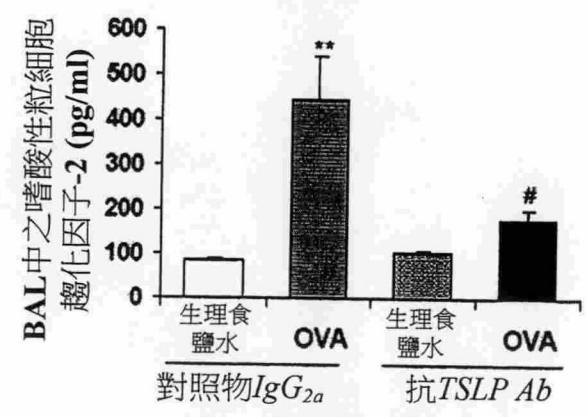
【圖3】



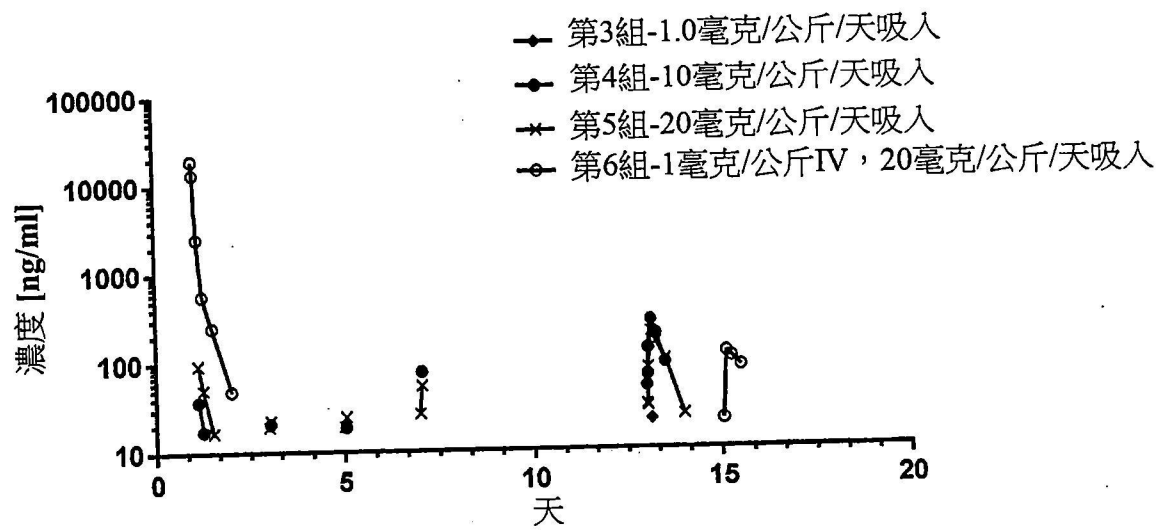
【圖4A】



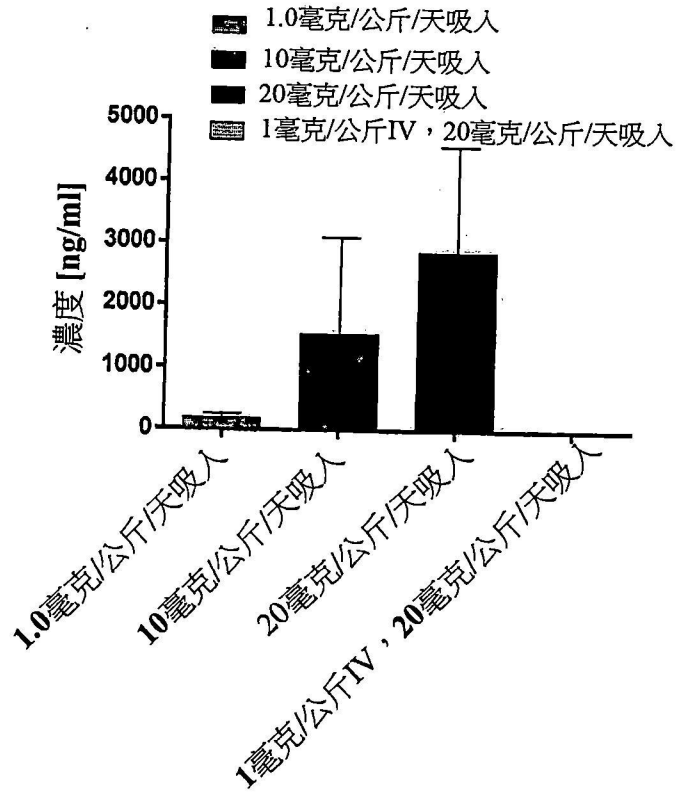
【圖4B】



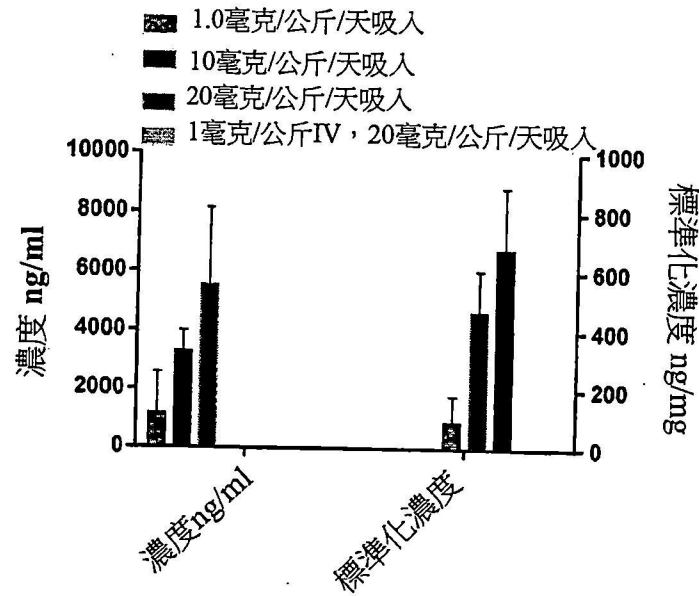
【圖4C】



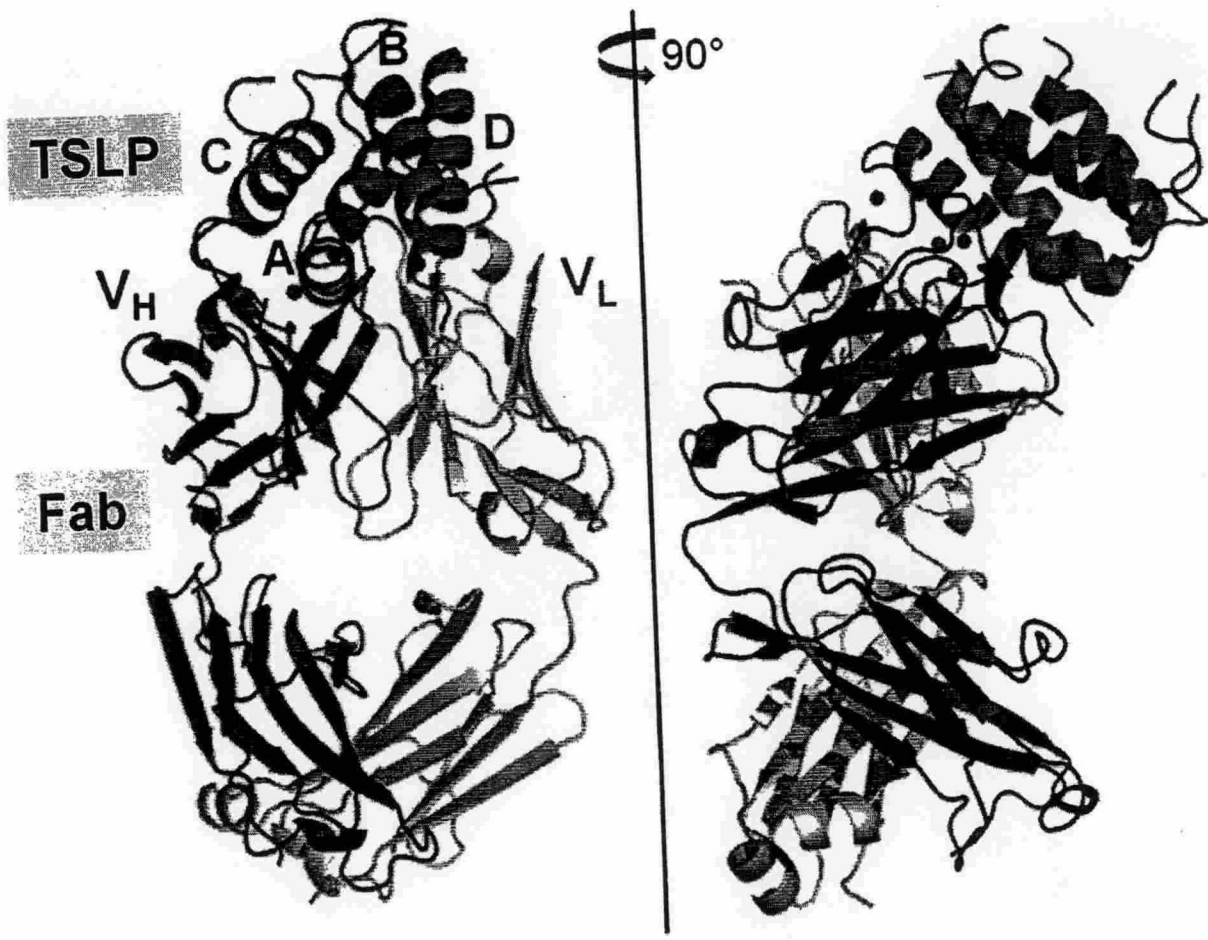
【圖5】



【圖6A】

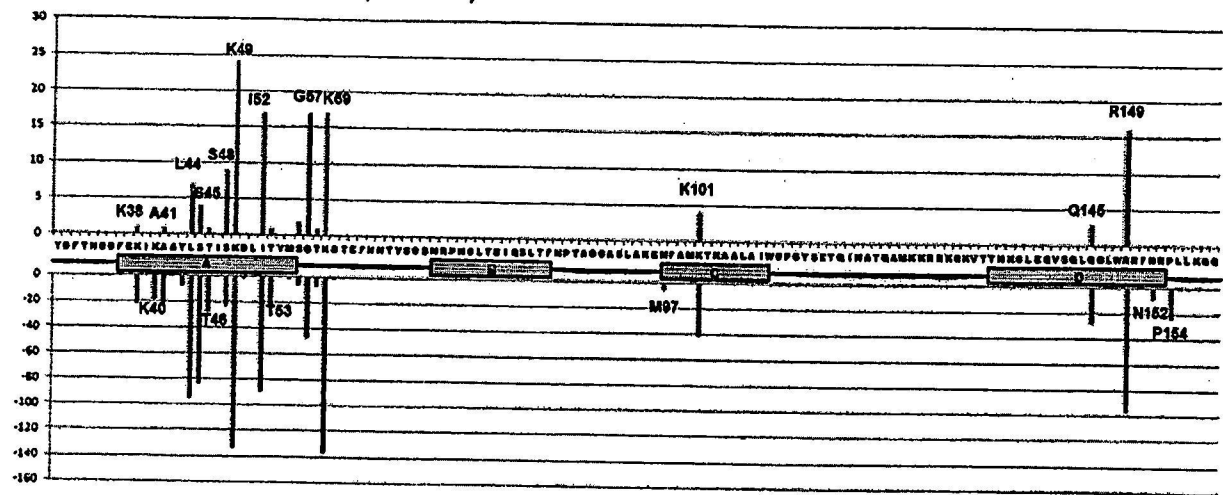


【圖6B】



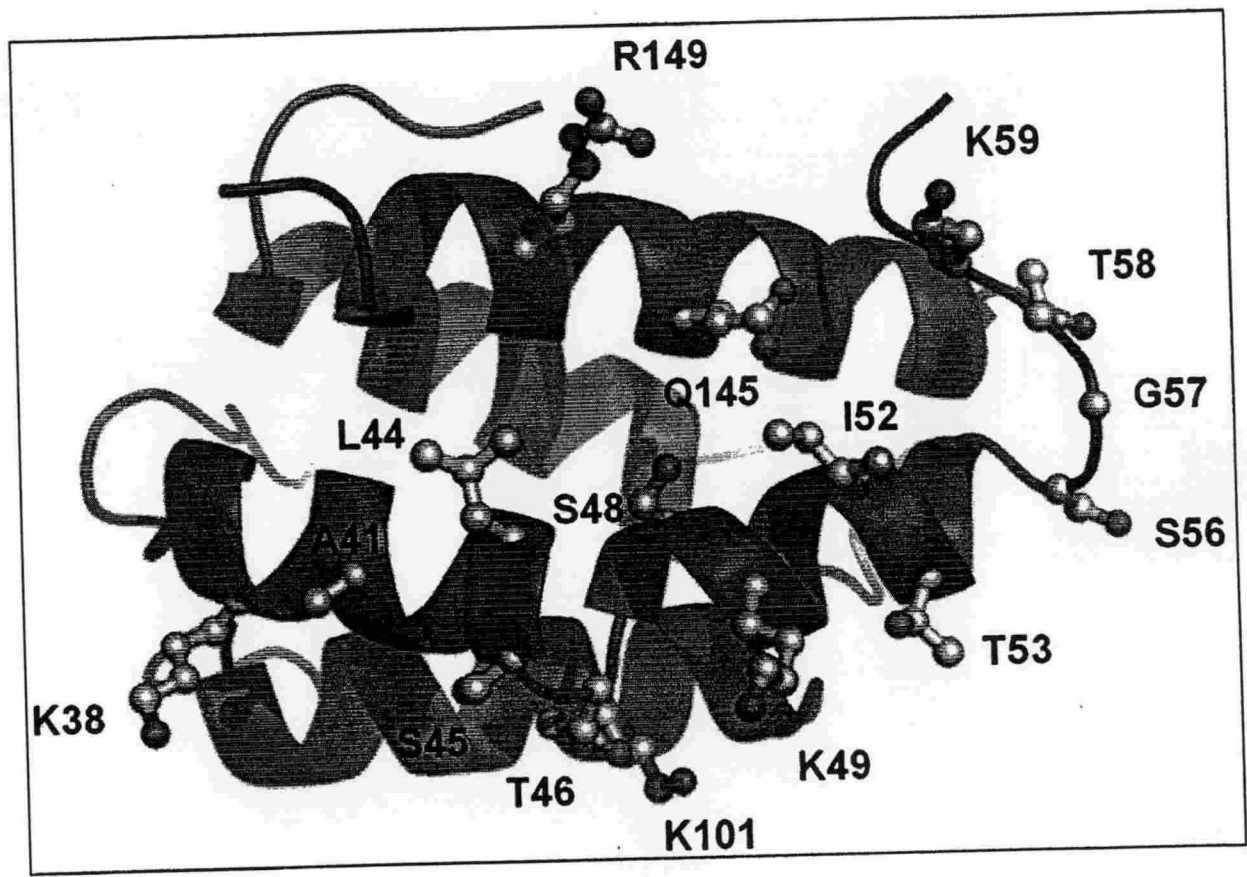
【圖7】

直接分子間接觸之數目 ( $\leq 4.0\text{\AA}$ )



溶劑可及表面減少 ( $\text{\AA}^2$ )

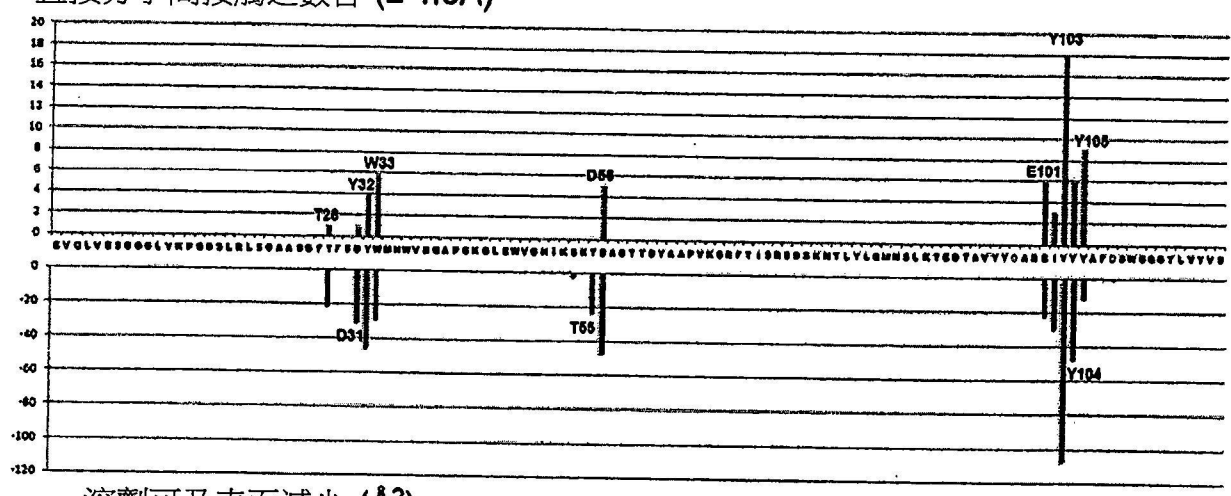
【圖8】



【圖9】



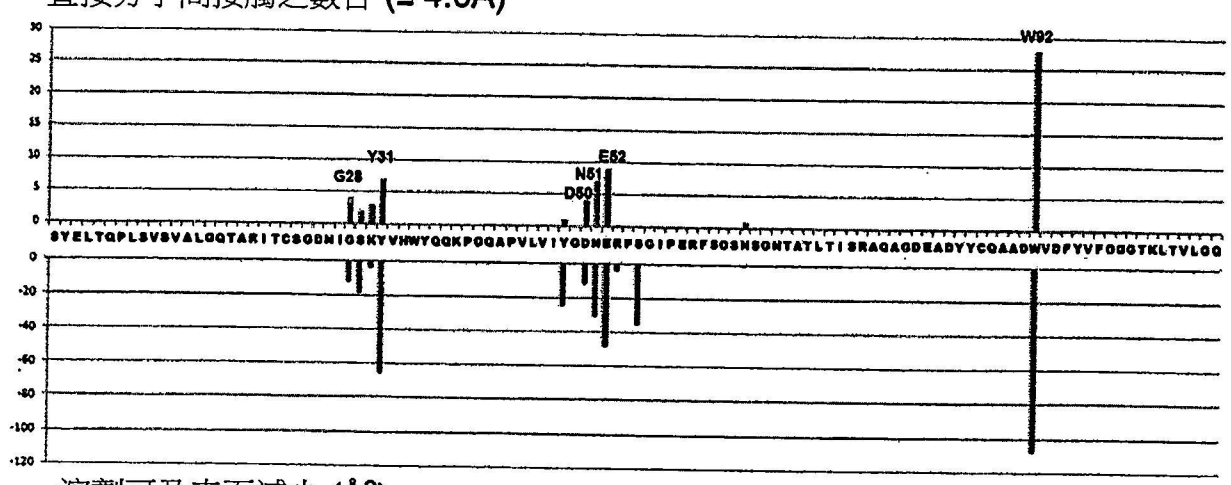
直接分子間接觸之數目 ( $\leq 4.0\text{\AA}$ )



溶劑可及表面減少 ( $\text{\AA}^2$ )

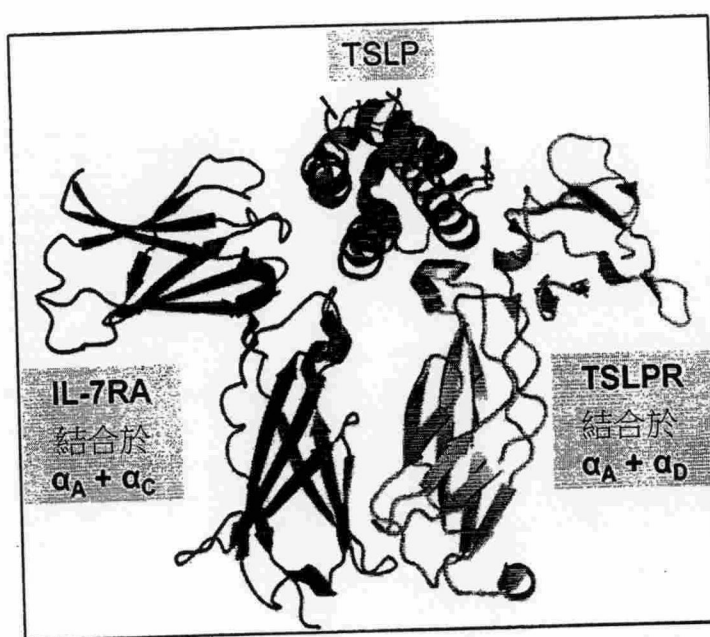
【圖10A】

直接分子間接觸之數目 ( $\leq 4.0\text{\AA}$ )

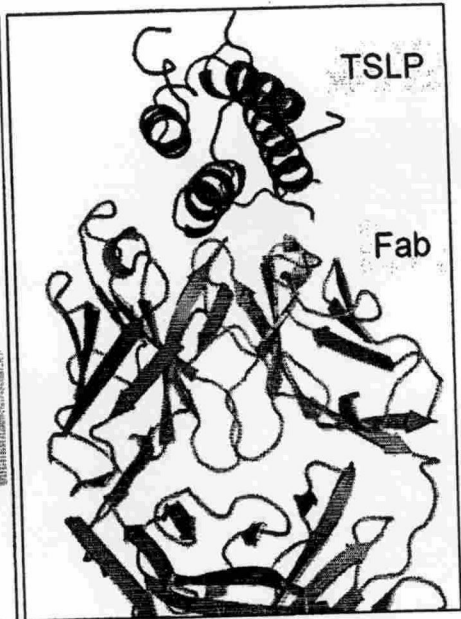


溶劑可及表面減少 ( $\text{\AA}^2$ )

【圖10B】



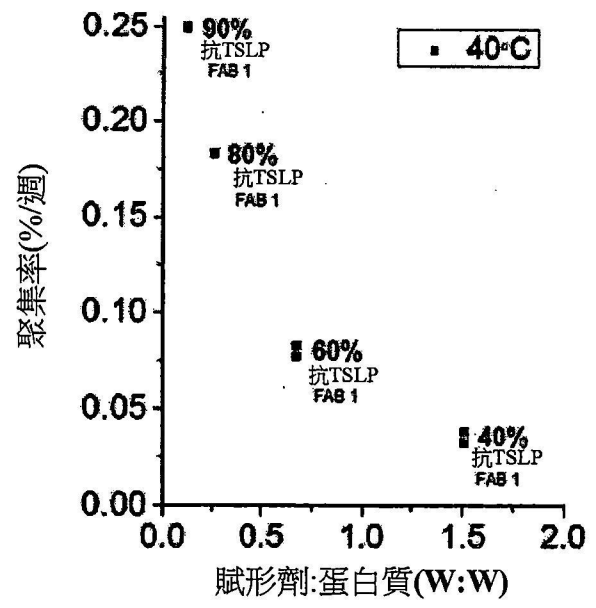
【圖11A】



【圖11B】



【圖11C】



【圖12】