

**УКРАЇНА****(19) UA****(11) 108088****(13) C2****(51) МПК****C12N 5/07** (2010.01)**C12P 21/08** (2006.01)**A61K 39/385** (2006.01)**A61P 37/02** (2006.01)

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2012 06781	(72) Винахідник(и):	Преста Леонард Г. (US)
(22) Дата подання заявки:	02.11.2010	(73) Власник(и):	МЕРК ШАРП ЕНД ДОМЕ КОРП., 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, New Jersey 07033, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.03.2015	(74) Представник:	Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/258,051, 61/297,008	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2008076321 A1, 26.06.2008. WO 2007096149 A1, 30.08.2007. "Anti-human TSLP Antibody AF1398", INTERNET CITATION, 15 February 2006, Retrieved from the Internet: URL: http://www.rndsystems.com/pdf/af1398.pdf [retrieved on 2007-01-01]. "Monoclonal Anti-human TSLP Antibody", INTERNET CITATION, 6 August 2005, Retrieved from the Internet: URL: http://www.rndsystems.com/pdf/MAB1398.pdf [retrieved on 2008-04-16]. SOUMELIS V ET AL: "Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP", NATURE IMMUNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 3, no. 7, 1 July 2002, pages 673-680.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	04.11.2009, 21.01.2010		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.09.2012, Бюл.№ 17		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.03.2015, Бюл.№ 6		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2010/055062, 02.11.2010		

(54) СКОНСТРУЙОВАНЕ АНТИТІЛО ПРОТИ TSLP**(57) Реферат:**

Винахід належить до антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, яке специфічно зв'язується з TSLP людини, а також до їх застосування, композиції, що містить антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, експресуючого вектора, клітини-хазяїна, способу супресії імунної відповіді.

UA 108088 C2

За даною заявкою запитується пріоритет згідно з попередньою патентною заявкою США № 61/297008, яка подана 21 січня 2010 року, і попередньою патентною заявкою США № 61/258051, яка подана 4 листопада 2009 року, кожна з яких включена в цей документ за допомогою посилання в повному об'ємі.

5 ГАЛУЗІ ВИНАХОДУ

Даний винахід в основному стосується специфічного антитіла до тимічного стромального лімфопоетину (TSLP) і його застосування, зокрема, при запальних і алергічних запальних порушеннях.

10 ПЕРЕДУМОВИ ВИНАХОДУ

TSLP являє собою імунний цитокін, який індукує опосередковані дендритними клітинами CD4⁺ Т-клітинні відповіді, в яких DC з проалогенним фенотипом, що активуються за допомогою TSLP, грають ключову роль в індукції і підтримці відповідей алергічних запальних Th2 і тучних клітин за допомогою продукування проалергенних цитокінів, хемокінів і костимулюючих молекул, які направляють перетворення наївних Т-клітин в Th2 клітини, продукуючі ключові медіатори алергічного запалення IL-4, IL-5 і IL-13. Надекспресія TSLP при atopічному дерматиті (AtD), синдромі Незертона і астмі вказує на ключову роль цього цитокіну в патогенезі цих алергічних запальних захворювань. Це підтверджене за допомогою моделей на тваринах, в яких трансгенна надекспресія TSLP в шкірі або легенях, а також видалення за допомогою направлено впливу на ген негативних регуляторів TSLP ведуть до алергічних запальних захворювань, які близько схожі з atopічним дерматитом або астмою людини. Даний винахід стосується сконструйованих антитіл до TSLP і їх застосування для лікування запальних і, зокрема, алергічних запальних порушень, що включають астму і atopічний дерматит.

Даний винахід уникає можливих проблем з дезамідуванням в антитіл попереднього рівня техніки. Дезамідування залишків Asn (N) являє собою звичайне розщеплення білків і воно може значно впливати на структуру і функцію білка. В антитілах Asn (N), розташовані в CDR, можуть піддаватися швидкому дезамідуванню, і це може вести до змін у взаємодіях антитіло-антиген і, отже, представляє серйозну проблему під час розробки терапевтичних засобів на основі антитіл. Див., наприклад, Vlaska et al., Analytical Biochemistry 392:145-154 (2009). Таким чином, важливо уникати цих можливих проблем з дезамідуванням в антитілах, які призначені для розробки для застосування у людини. Крім того, важливо уникати цих проблем без зміни яких-небудь важливих характеристик (таких як афінність зв'язування) антитіла.

30 СУТЬ ВИНАХОДУ

Даний винахід стосується зв'язувальної сполуки, специфічно зв'язувальної TSLP людини, що містить щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга антитіла або її TSLP-зв'язувальний фрагмент, при цьому вказана варіабельна область важкого ланцюга містить SEQ ID NO: 2.

Даний винахід також стосується зв'язувальної сполуки, яка специфічно зв'язує TSLP людини, що містить щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга антитіла або її TSLP-зв'язувальний фрагмент, при цьому вказана варіабельна область важкого ланцюга містить щонайменше SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 1 або SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 3.

Даний винахід також стосується зв'язувальної сполуки, яка специфічно зв'язує TSLP людини, що містить щонайменше одну варіабельну область важкого ланцюга антитіла або її TSLP-зв'язувальний фрагмент, при цьому вказана варіабельна область важкого ланцюга містить SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 3.

Зв'язувальні сполуки за винаходом можуть додатково містити одну варіабельну область легкого ланцюга антитіла або її TSLP-зв'язувальний фрагмент. В одному з варіантів здійснення варіабельна область легкого ланцюга антитіла або її TSLP-зв'язувальний фрагмент, містить щонайменше одну послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO: 4, 5 і 6. В іншому варіанті здійснення варіабельна область легкого ланцюга антитіла або її TSLP-зв'язувальний фрагмент, містить щонайменше дві послідовності, вибрані з групи, що складається з SEQ ID NO: 4, 5 і 6. В інших варіантах здійснення варіабельна область легкого ланцюга антитіла або її TSLP-зв'язувальний фрагмент, містить три послідовності, приведені в SEQ ID NO: 4, 5 і 6.

У деяких варіантах здійснення описаних вище зв'язувальних сполук, вся або по суті вся інша частина варіабельної області важкого ланцюга являє собою всю або по суті всю область Ig людини; і вся або по суті вся інша частина варіабельної області легкого ланцюга являє собою всю або по суті всю область Ig людини. У переважних варіантах здійснення інша частина варіабельної області важкого ланцюга являє собою амінокислотну послідовність важкого ланцюга людини; і інша частина варіабельної області легкого ланцюга являє собою амінокислотну послідовність легкого ланцюга людини.

Даний винахід також стосується зв'язувальної сполуки, яка специфічно зв'язує TSLP людини, що містить: варіабельну область важкого ланцюга, яка містить послідовність, вибрану з групи, що складається з: (i) SEQ ID NO: 7; (ii) SEQ ID NO: 7 або варіанту, що містить аж до 3 модифікованих амінокислотних залишків; і (iii) послідовності, що має щонайменше 97 % гомологію з SEQ ID NO: 7. В одному з варіантів здійснення варіабельна область важкого ланцюга містить послідовність, представлену в SEQ ID NO: 7. У деяких варіантах здійснення зв'язувальна сполука за винаходом додатково містить варіабельну область легкого ланцюга. В одному з варіантів здійснення варіабельна область легкого ланцюга містить послідовність, вибрану з групи, що складається з: (i) SEQ ID NO: 8; (ii) SEQ ID NO: 8 або варіанту, що містить аж до 3 модифікованих амінокислотних залишків; і (iii) послідовності, що має щонайменше 97 % гомологію з SEQ ID NO: 8. В одному з варіантів здійснення варіабельна область легкого ланцюга містить послідовність, представлену в SEQ ID NO: 8.

У переважному варіанті здійснення зв'язувальна сполука містить варіабельну область важкого ланцюга, яка містить послідовність, представлену в SEQ ID NO: 7, і варіабельну область легкого ланцюга, яка містить послідовність, представлену в SEQ ID NO: 8.

У деяких варіантах здійснення зв'язувальні сполуки за винаходом також містять константну область важкого ланцюга і/або константну область легкого ланцюга. В одному з варіантів здійснення константна область важкого ланцюга містить константну область важкого ланцюга людини $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ або $\gamma 4$ або її варіант. В інших варіантах здійснення константна область легкого ланцюга містить константну область легкого ланцюга людини κ або λ .

У деяких варіантах здійснення зв'язувальна сполука за винаходом являє собою антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент. У різних варіантах здійснення антитіло або його фрагмент за даним винаходом є поліклональним, моноклональним, химерним, циноїзованим, гуманізованим або повністю людським. У переважному варіанті здійснення антитіло являє собою гуманізоване антитіло або його фрагмент.

Даний винахід також передбачає, що зв'язувальний фрагмент являє собою фрагмент антитіла, вибраний з групи, що складається з Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂ і діатіла. Даний винахід також передбачає, що зв'язувальна сполука являє собою нанотіло, авімер або аптімер.

В одному з варіантів здійснення зв'язувальна сполука являє собою антитіло, що містить важкий ланцюг, який містить SEQ ID NO: 11. В одному з варіантів здійснення зв'язувальна сполука містить важкий ланцюг, що містить SEQ ID NO: 11, і легкий ланцюг, що містить SEQ ID NO: 12.

В іншому переважному варіанті здійснення зв'язувальна сполука за винаходом зв'язує TSLP людини і яванської макаки.

В одному з варіантів здійснення зв'язувальну сполуку за винаходом можна експресувати з експресуючого вектора, депонованого під номером депозиту ATCC PTA-10482.

В іншому варіанті здійснення зв'язувальна сполука за винаходом містить важкий ланцюг і легкий ланцюг, які можна експресувати з експресуючого вектора, депонованого під номером депозиту ATCC PTA-10482. В іншому варіанті здійснення зв'язувальна сполука за винаходом містить варіабельну область важкого ланцюга і варіабельну область легкого ланцюга, які можна експресувати з експресуючого вектора, депонованого під номером депозиту ATCC PTA-10482. В іншому варіанті здійснення зв'язувальна сполука за винаходом містить області CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 і CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3 антитіла, експресовані за допомогою експресуючого вектора, депонованого під номером депозиту ATCC PTA-10482.

В іншому варіанті здійснення зв'язувальна сполука за винаходом містить важкий ланцюг, який можна експресувати з експресуючого вектора, депонованого під номером депозиту ATCC PTA-10482. В іншому варіанті здійснення зв'язувальна сполука за винаходом містить варіабельну область важкого ланцюга, яку можна експресувати з експресуючого вектора, депонованого під номером депозиту ATCC PTA-10482. В іншому варіанті здійснення зв'язувальна сполука за винаходом містить області CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 антитіла, експресовані за допомогою експресуючого вектора, депонованого під номером депозиту ATCC PTA-10482.

Даний винахід також стосується ізольованих нуклеїнових кислот, що кодують зв'язувальну сполуку за винаходом. В одному з варіантів здійснення винахід містить нуклеїнову кислоту, що кодує варіабельну область важкого ланцюга зв'язувальної сполуки (наприклад, антитіла або фрагмента антитіла) за винаходом. В іншому варіанті здійснення винахід містить нуклеїнову кислоту, що кодує зв'язувальну сполуку, що містить варіабельну область важкого ланцюга, де вказана варіабельна область важкого ланцюга містить SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 і SEQ ID NO: 3. В іншому варіанті здійснення винахід містить нуклеїнову кислоту, що кодує SEQ ID NO: 7. В іншому варіанті здійснення винахід містить нуклеїнову кислоту, що кодує SEQ ID NO: 2. В

одному з варіантів здійснення винахід містить нуклеїнову кислоту, що кодує варіабельну область важкого ланцюга, експресуючим вектором, що кодується, депонованим під номером депозиту ATCC PTA-10482. Винахід також передбачає експресуючі вектори, що містять нуклеїнові кислоти за винаходом, функціонально пов'язані з керуючими послідовностями, які розпізнає клітина-хазяїн, коли клітину-хазяїна трансфікують вектором. В одному з варіантів здійснення винахід стосується експресуючого вектора, депонованого під номером депозиту ATCC PTA-10482. Також передбачені клітини-хазяї, що містять ці експресуючі вектори, і способи застосування цих експресуючих векторів для отримання поліпептидів. В одному з варіантів здійснення клітина-хазяїн містить експресуючий вектор, депонований під номером депозиту ATCC PTA-10482. Способи отримання поліпептиду містять стадії: культивування клітини-хазяїна в культуральному середовищі в умовах, в яких відбувається експресія послідовності нуклеїнової кислоти, тим самим отримуючи поліпептиди, що містять варіабельні області легкого і важкого ланцюга; і витягання поліпептидів з клітини-хазяїна або середовища для культивування. В одному з варіантів здійснення винахід містить спосіб отримання поліпептиду, що включає стадії: культивування клітини-хазяїна, яка містить експресуючий вектор, депонований під номером депозиту ATCC PTA-10482, в культуральному середовищі в умовах, в яких відбувається експресія вектора, тим самим отримуючи поліпептиди, що містять варіабельні області легкого і важкого ланцюга; і витягання поліпептидів з клітини-хазяїна або середовища для культивування.

Даний винахід стосується способу супресії імунної відповіді у суб'єкта людини, що включає введення суб'єкту, потребуючому цього, зв'язувальної сполуки відповідно до винаходу, яка специфічно зв'язує TSLP людини, в кількості, ефективній для блокування біологічної активності TSLP. Даний винахід також передбачає введення додаткового імуносупресорного або протизапального засобу. У переважному варіанті здійснення імунна відповідь являє собою астму. В іншому переважному варіанті здійснення імунна відповідь являє собою алергічне запалення. В іншому переважному варіанті здійснення алергічне запалення являє собою алергічний риносинусит, алергічну астму, алергічний кон'юнктивіт або atopічний дерматит. В іншому переважному варіанті здійснення імунна відповідь являє собою фіброз, запальне захворювання кишечника або лімфому Ходжкіна. в іншому переважному варіанті здійснення зв'язувальну сполуку вводять в поєднанні з іншим імуномодуючим засобом.

Зв'язувальна сполука за даним винаходом може являти собою композицію, що містить зв'язувальну сполуку за винаходом (наприклад, антитіло або його фрагмент) в поєднанні з фармацевтично прийнятним носієм або розріджувачем. У додатковому варіанті здійснення композиція додатково містить імуносупресорний або протизапальний засіб.

У різних варіантах здійснення винахід стосується лікарських засобів, що містять зв'язувальну сполуку (наприклад, антитіло або його фрагмент) за даним винаходом. Наприклад, даний винахід стосується застосування зв'язувальної сполуки, яке специфічно зв'язує TSLP людини, для отримання лікарського засобу для супресії імунної відповіді. Даний винахід стосується застосування зв'язувальної сполуки, яке специфічно зв'язує TSLP людини (наприклад, будь-яку одну із зв'язувальних сполук відповідно до винаходу), для отримання лікарського засобу для лікування астми. Даний винахід стосується застосування зв'язувальної сполуки, яка специфічно зв'язує TSLP людини, для отримання лікарського засобу для лікування запального порушення. В одному з варіантів здійснення запальне порушення являє собою алергічне запальне порушення. В одному з варіантів здійснення алергічне запальне порушення являє собою алергічний риносинусит, алергічну астму, алергічний кон'юнктивіт або atopічний дерматит. У переважному варіанті здійснення алергічне запальне порушення являє собою алергічну астму. В іншому переважному варіанті здійснення алергічне запальне порушення являє собою atopічний дерматит. Наприклад, антитіла і фрагмент за даним винаходом можна використати для лікування людини.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУРИ

Фіг. 1 - вирівнювання SEQ ID NO: 11 по поточній заявці відносно SEQ ID NO: 14 WO 2008/076321.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС

Як застосовують в цьому документі, включаючи прикладену формулу винаходу, форми слів в однині включають відповідні ним посилання на форми множини доти, поки контекст явно не диктує інше. Всі посилання, що цитуються в даному документі, включені за допомогою посилання в такій же мірі, як яби конкретно і індивідуально вказали, що кожна окрема публікація, патентна заявка або патент включений шляхом посилання.

I. Визначення

"Активаци́я", "стимуля́ція" і "лікува́ння", як це застосовують до клітин або рецепторів, можуть мати таке ж значення, наприклад, активація, стимуляція або лікування клітини або рецептора лігандом, якщо не вказане інше за допомогою контексту або в явній формі. "Ліганд" охоплює природні і синтетичні ліганди, наприклад, цитокіни, варіанти цитокінів, аналоги, мутеїни і зв'язувальні композиції, отримані з антитіл. "Ліганд" також охоплює низькомолекулярні сполуки, наприклад, пептидоміметики цитокінів і пептидоміметики антитіл. "Активаци́я" може стосуватися активації клітини, яку регулюють за допомогою внутрішніх механізмів, а також за допомогою зовнішніх факторів або факторів навколишнього середовища. "Відповідь", наприклад, клітини, тканини, органу або організму, охоплює зміну біохімічного або фізіологічного стану, наприклад, концентрації, щільності, адгезії або міграції всередині біологічного компартменту, рівня експресії гена або стану диференціації, де зміна корелює з активацією, стимуляцією або лікуванням або з внутрішніми механізмами, такими як генетичне програмування.

"Активність" молекули може описувати або стосуватися зв'язування молекули з лігандом або з рецептором, каталітичної активності; здатності стимулювати експресію гена або клітинну сигналізацію, диференціацію або дозрівання; антигенної активності, модуляції активності інших молекул і т. п. "Активність" також може означати питому активність, наприклад, [каталітичну активність]/[мг білка], або [імунологічну активність]/[мг білка], концентрацію в біологічному компартменті або т. п.

"Введення" і "лікування", як це застосовують до тварини, людини, експериментального суб'єкта, клітини, тканини, органу або біологічної текучої речовини, стосується контакту екзогенного фармацевтичного, терапевтичного, діагностичного засобу або композиції з твариною, людиною, суб'єктом, клітиною, тканиною, органом або біологічною текучою речовиною. "Введення" і "лікування" можуть стосуватися, наприклад, терапевтичних, фармакокінетичних, діагностичних, дослідницьких і експериментальних способів. Лікування клітини включає контакт реактиву з клітиною, а також контакт реактиву з текучою речовиною, де текуча речовина знаходиться в контакті з клітиною. "Введення" і "лікування" також означають лікування *in vitro* і *ex vivo*, наприклад, клітини, за допомогою реактиву, діагностичного засобу, зв'язувальної композиції або за допомогою іншої клітини. "Лікування", як це застосовують у людини, ветеринарного або дослідницького суб'єкта, стосується терапевтичного лікування, профілактичних або запобіжних засобів, дослідницьких і діагностичних застосувань.

"Зв'язувальна сполука" стосується молекули, яка містить одну або декілька амінокислотних послідовностей, які специфічно зв'язуються з TSLP людини. В одному з переважних варіантів здійснення зв'язувальна сполука являє собою антитіло, переважно ізольоване антитіло. В іншому переважному варіанті здійснення зв'язувальна сполука містить антигензв'язувальний фрагмент антитіла.

"Зв'язувальна композиція" стосується TSLP-зв'язувальної сполуки в поєднанні зі стабілізатором, ексципієнтом, сіллю, буфером, розчинником або добавкою, яка здатна зв'язуватися з мішенню.

Об'єм даного винаходу також включає комплекси, що містять будь-яке антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за даним винаходом, утворюючи комплекс з поліпептидом TSLP або його антигенним фрагментом. Комплекси можна отримувати за допомогою приведення антитіла або фрагмента в контакт з поліпептидом TSLP або фрагментом антигену.

Як застосовують в цьому документі, термін "антитіло" стосується будь-якої форми антитіла або його фрагмента, який виявляє бажану біологічну активність. Таким чином, його використовують в самому широкому значенні і він зокрема охоплює моноклональні антитіла (включаючи повнорозмірні моноклональні антитіла), поліклональні антитіла, поліспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) і фрагменти антитіл при умові, що вони виявляють бажану біологічну активність. "Ізольоване антитіло" стосується стану очищення зв'язувальної сполуки і в такому контексті означає, що молекула по суті звільнена від інших біологічних молекул, таких як нуклеїнові кислоти, білки, ліпіди, вуглеводи або інші речовини, такі як клітинний дебрис і середовища для вирощування. Загалом, термін "ізольований" не призначений для того, щоб вказувати на повну відсутність такої речовини або на відсутність води, буферів або солей доти, поки вони не присутні в кількостях, які по суті перешкоджають експериментальному або терапевтичному застосуванню зв'язувальної сполуки, як описано в цьому документі.

"Fab фрагмент" складається з одного легкого ланцюга і CH1 і варіабельних областей одного важкого ланцюга. Важкий ланцюг Fab молекули не може утворювати дисульфідний зв'язок з іншою молекулою важкого ланцюга.

"Fc" область містить два фрагменти важкого ланцюга, що містять домени CH2 і CH3 антитіла. Два фрагменти важкого ланцюга утримуються разом за допомогою двох або більше дисульфідних зв'язків і за допомогою гідрофобних взаємодій доменів CH3.

5 "Фрагмент Fab'» містить один легкий ланцюг і частину або фрагмент одного важкого ланцюга, який містить домен VH і домен CH1, а також область між доменами CH1 і CH2 так, що міжланцюговий дисульфідний зв'язок можна сформувати між двома важкими ланцюгами двох фрагментів Fab', щоб сформувати молекулу F(ab')₂.

10 "Фрагмент F(ab')₂" містить два легкі ланцюги і два важкі ланцюги, що містять частину константної області між доменами CH1 і CH2, так що міжланцюговий дисульфідний зв'язок формують між двома важкими ланцюгами. Таким чином, фрагмент F(ab')₂ складається з двох фрагментів Fab', які утримуються разом за допомогою дисульфідного зв'язку між двома важкими ланцюгами.

"Область Fv" містить варіабельні області як з важкого, так і з легкого ланцюга, але не містить константної області.

15 Як застосовують в цьому документі, термін "TSLP-зв'язувальний фрагмент" або "його зв'язувальний фрагмент" охоплює фрагмент або похідне антитіла (або іншої зв'язувальної речовини), які по суті все ще зберігають його біологічну активність інгібування активності TSLP. Отже, термін "фрагмент антитіла" або TSLP-зв'язувальний фрагмент стосується частини повнорозмірного антитіла, як правило, його антигензв'язувальної або варіабельної області.

20 Приклади фрагментів антитіл включають фрагменти Fab, Fab', F(ab')₂ і Fv; діатіла; лінійні антитіла; одноланцюжкові молекули антитіл, наприклад, sc-Fv; доменні антитіла; і поліспецифічні антитіла, сформовані з фрагментів антитіл. Типово, зв'язувальний фрагмент або похідне зберігає щонайменше 10 % його TSLP-інгібіторної активності. Переважно, зв'язувальний фрагмент або похідне зберігає щонайменше 25 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %

25 або 100 % (або більш) його TSLP-інгібіторної активності, хоча буде корисний будь-який зв'язувальний фрагмент з достатньою афінністю для того, щоб викликати бажаний біологічний ефект. Також передбачається, що TSLP-зв'язувальний фрагмент може містити консервативні амінокислотні заміни, які по суті не змінюють його біологічну активність.

Термін "моноклональне антитіло", як застосовують в цьому документі, стосується антитіла, отриманого з популяції по суті гомогенних антитіл, тобто, окремі антитіла, що входять до складу популяції, ідентичні за винятком можливих мутацій, що зустрічаються в природі, які можуть бути присутніми в незначних кількостях. Моноклональні антитіла високо специфічні, направлені проти одного антигенного епітопу. На відміну від цього, препарати стандартних (поліклональних) антитіл типово містять декілька антитіл, направлених проти (або специфічних до) різних епітопів. Визначення "моноклональний" вказує на характер антитіл, як отриманих з по

35 суті гомогенної популяції антитіл, і його не треба розглядати як вимогу отримувати антитіла за допомогою якого-небудь конкретного способу. Наприклад, моноклональні антитіла, що підлягають застосуванню відповідно до даного винаходу, можна створювати за допомогою гібридомного способу, вперше описаного авторами Kohler et al., (1975) Nature 256: 495, або

40 можна створювати за допомогою способів рекомбінантної ДНК (див., наприклад, патент США № 4816567). "Моноклональні антитіла" також можна ізолювати з бібліотек фагових антитіл із застосуванням способів, описаних, наприклад, в Clackson et al., (1991) Nature 352: 624-628 і Marks et al., (1991) J. Mol. Biol. 222: 581-597.

Моноклональні антитіла в цьому документі зокрема включають "химерні" антитіла (імуноглобуліни), в яких частина важкого і/або легкого ланцюга ідентична або гомологічна відповідним послідовностям в антитілах, отриманих від конкретних видів або, що належать до конкретного класу або субкласу антитіл, тоді як інша частина ланцюга(ів) ідентична або гомологічна відповідним послідовностям в антитілах, отриманих від інших видів або, що належать іншому класу або субкласу антитіл, а також фрагменти таких антитіл при умові, що

50 вони виявляють бажану біологічну активність (патент США № 4816567; і Morrison et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855).

"Доменне антитіло" являє собою імунологічний функціональний фрагмент імуноглобуліну, що містить тільки варіабельну область важкого ланцюга або варіабельну область легкого ланцюга. У деяких випадках, дві або більше області VH ковалентно з'єднані з пептидним

55 лінкером для створення бівалентного доменного антитіла. Дві області VH бівалентного доменного антитіла можуть бути націлені на однакові або різні антигени.

"Бівалентне антитіло" містить дві антигензв'язувальні ділянки. У деяких випадках два сайти зв'язування мають однакову антигенну специфічність. Однак бівалентні антитіла можуть бути біспецифічними.

Як застосовують в цьому документі, термін "одноланцюжкове Fv" або "scFv" антитіло стосується фрагментів антитіл, що містять VH і VL домени антитіла, де ці домени присутні в одному поліпептидному ланцюгу. Загалом, Fv поліпептид додатково містить поліпептидний лінкер між VH і VL доменами, який дозволяє sFv формувати бажану структуру для зв'язування антигену. Огляд по sFv див. в Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315.

Моноклональні антитіла в цьому документі також включають камелізовані однодомени антитіла. Див., наприклад, Muyldermans et al. (2001) Trends Biochem. Sci. 26:230; Reichmann et al. (1999) J. Immunol. Methods 231:25; WO 94/04678; WO 94/25591; патент США № 6005079, які включені, таким чином, за допомогою посилання в повному об'ємі). В одному з варіантів здійснення даний винахід стосується однодомених антитіл, що містять два VH домени з такими модифікаціями, що вони формують однодоменні антитіла.

Як застосовують в цьому документі, термін "діатіла" стосується малих фрагментів антитіл з двома антигенів'язувальними сайтами, ці фрагменти містять варіабельний домен (VH) важкого ланцюга, з'єднаний з варіабельним доменом легкого ланцюга (VL) в одному і тому ж поліпептидному ланцюгу (VH-VL або VL-VH). Використовуючи лінкер, який дуже короткий для того, щоб зробити можливим утворення пар між двома доменами одного ланцюга, домени примушують утворювати пари з комплементарними доменами іншого ланцюга і створювати два антигензв'язувальних сайти. Більш повно діатіла описані, наприклад, в EP 404097; WO 93/11161; і Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448. Загалом, огляд по сконструйованих варіантах антитіл див. в Holliger and Hudson (2005) Nat. Biotechnol. 23:1126-1136.

Як застосовують в цьому документі, термін "гуманізоване антитіло" стосується форм антитіл, які містять послідовності з надлюдських антитіл (наприклад, антитіл миші), а також антитіл людини. Такі антитіла містять мінімальну послідовність, отриману з надлюдського імуноглобуліну. Загалом, гуманізоване антитіло повинно містити по суті всі з щонайменше одного і типово двох варіабельних доменів, в яких все або по суті всі гіперваріабельні петлі відповідають таким надлюдського імуноглобуліну і всі або по суті всі FR області являють собою такі послідовності імуноглобуліну людини. Гуманізоване антитіло необов'язково також повинно містити щонайменше частину константної області імуноглобуліну (Fc), типово такого імуноглобуліну людини. Префікс "h", "hu" або "hum" додають до позначення клону антитіла, коли необхідно відрізнити гуманізовані антитіла (наприклад, "hu23B12") від батьківських антитіл гризунів (наприклад, "rat 23B12" або "r23B12"). Гуманізовані форми антитіл гризунів, як правило, повинні містити ті ж послідовності CDR батьківських антитіл гризунів, хоча певні заміни амінокислот можуть бути включені для підвищення афінності або підвищення стабільності гуманізованого антитіла.

Антитіла за даним винаходом також включають антитіла з модифікованими (або блокованими) Fc-областями, щоб забезпечити змінені ефекторні функції. Див., наприклад, патент США № 5624821; WO 2003/086310; WO 2005/120571; WO 2006/0057702; Presta (2006) Adv. Drug Delivery Rev. 58:640-656. Такі модифікації можна використати для посилення або супресії різних реакцій імунної системи, з можливими позитивним впливом в діагностиці і терапії. Зміни Fc-області включають зміни амінокислот (заміни, делеції і інсерції), глікозилювання або деглікозилювання і додання декількох Fc. Зміни в Fc також можуть змінювати час напівжиття антитіл у терапевтичних антитіл і більш тривалий час напівжиття повинний приводити до менш частого дозування з супутньою підвищеною зручністю і зниженням застосуванням речовини. Див. Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:131 на 734-35.

Термін "повністю антитіло людини" стосується антитіла, яке містить тільки білкові послідовності імуноглобулінів людини. Повністю антитіло людини може містити вуглеводні ланцюги миші, якщо його продукує миша, клітина миші або гібридома, отримана з клітини миші. Аналогічним чином, "антитіло миші" стосується антитіла, яке містить тільки послідовності імуноглобулінів миші.

Як застосовують в цьому документі, термін "гіперваріабельна область" стосується амінокислотних залишків антитіла, які відповідають за зв'язування антигену. Гіперваріабельна область містить амінокислотні залишки з "визначаючої комплементарності області" або "CDR" (наприклад, залишки 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) і 89-97 (CDRL3) у варіабельному домені легкого ланцюга і залишки 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) і 95-102 (CDRH3) у варіабельному домені важкого ланцюга; Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) і/або такі залишки з "гіперваріабельної петлі" (тобто залишки 26-32 (L1), 50-52 (L2) і 91-96 (L3) у варіабельному домені легкого ланцюга і 26-32 (H1), 53-55 (H2) і 96-101 (H3) у варіабельному домені важкого

ланцюга; Chothia and Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917). Як застосовують в цьому документі, термін "каркасні" або "FR" залишки стосується тих залишків варіабельного домену, які відрізняються від залишків гіперваріабельної області, що визначаються в цьому документі як залишки CDR. Наведена вище нумерація залишків стосується системи нумерації по Kabat і не

обов'язкова точно відповідає нумерації в послідовностях в супровідному списку послідовностей. "Зв'язування" стосується утворення зв'язку між зв'язувальною композицією і мішенню, де утворення зв'язку веде до зниження нормального броунівського руху зв'язувальної композиції у випадках, коли зв'язувальна композиція може бути розчинена або суспендована в розчині.

"Консервативно модифіковані варіанти" або "консервативні заміни" стосується заміні амінокислот, які відомі фахівцям в даній галузі і можуть бути створені, як правило, без зміни біологічної активності отриманої молекули. Фахівці в даній галузі визнають, загалом, що одиночні заміни амінокислот не у важливих областях поліпептиду по суті не змінюють біологічну активність (див., наприклад, Watson, et al, Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Edition 1987)). Такі зразкові заміни переважно створюють відповідно до тих, що приведені в наступній таблиці 1:

Таблиця 1

Зразкові консервативні амінокислотні заміни

Вихідний залишок	Консервативна заміна
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

«Ефективна кількість» охоплює кількість, достатню для того, щоб поліпшувати або запобігати симптому або ознаці медичного стану. Ефективна кількість також означає кількість, достатню для того, щоб зробити можливим або полегшити діагностику. Ефективна кількість для конкретного пацієнта або ветеринарного суб'єкта може варіювати в залежності від чинників, таких як стан, який лікують, загальний стан здоров'я пацієнта, шлях і доза для способу введення і тяжкість побічних ефектів (див., наприклад, патент США № 5888530, виданий Netti, et al.). Ефективна кількість може являти собою максимальну дозу або протокол дозування, який унікає значних побічних ефектів або токсичних ефектів. Ефект повинен приводити до поліпшення діагностичної міри або параметра щонайменше на 5 %, звичайно щонайменше на 10 %, більш звичайно щонайменше на 20 %, найбільш звичайно щонайменше на 30 %, переважно щонайменше на 40 %, більш переважно щонайменше на 50 %, найбільш переважно щонайменше на 60 %, ідеально щонайменше 70 %, більш ідеально щонайменше 80 % і найбільш ідеально щонайменше на 90 %, де 100 % визначають як діагностичний параметр, який виявляє нормальний суб'єкт (див., наприклад, Maynard, et al. (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK).

Як застосовують в цьому документі, термін "ізольована молекула нуклеїнової кислоти" стосується молекули нуклеїнової кислоти, яку ідентифікують і відділяють щонайменше від однієї забруднюючої молекули нуклеїнової кислоти, разом з якою вона, як правило, асоційована в

природному джерелі нуклеїнової кислоти антитіла. Ізольована молекула нуклеїнової кислоти відрізняється від тієї форми або оточення, в яких її знаходять в природі. Отже, ізольовані молекули нуклеїнової кислоти відрізняються від молекули нуклеїнової кислоти, як вона існує в природних клітинах. Однак, ізольована молекула нуклеїнової кислоти містить молекулу

5 нуклеїнової кислоти, що міститься в клітинах, які як правило, експресують антитіло, де, наприклад, молекула нуклеїнової кислоти знаходиться в хромосомній локалізації, відмінній від такої в природній клітині.

Вираження "керуючі послідовності" стосується послідовностей ДНК, необхідних для експресії функціонально пов'язаної кодуєчої послідовності в конкретному організмі-хазяїні. Керуючі послідовності, які підходять для прокаріотів, наприклад, містять промотор,

10 необов'язково послідовність оператора і ділянку зв'язування рибосоми. Відомо, що еукаріотичні клітини використовують промотори, сигнали поліаденилювання і енхансери.

Нуклеїнова кислота є "функціонально пов'язаною", коли вона знаходиться в функціональному взаємозв'язку з іншою послідовністю нуклеїнової кислоти. Наприклад, ДНК

15 для передпослідовності або секреторної лідерної послідовності функціонально пов'язана з ДНК для поліпептиду, якщо відбувається її експресія у вигляді білка-попередника, який бере участь в секреції поліпептиду; промотор або енхансер функціонально пов'язаний з кодуєчою послідовністю, якщо він впливає на транскрипцію послідовності; або ділянка зв'язування рибосоми функціонально пов'язана з кодуєчою послідовністю, якщо вона розташована з тим,

20 щоб полегшувати трансляцію. Загалом, "функціонально пов'язані" означає, що послідовності ДНК, що є пов'язаними, суміжними, і, у випадку секреторної лідерної послідовності суміжні і в фазі зчитування. Однак енхансери не повинні бути суміжними. Зв'язування здійснюють за допомогою лігування в зручних ділянках рестрикції. Якщо такі сайти не існують, синтетичні олігонуклеотидні адаптери або лінкери використовують відповідно до стандартної практики.

Як застосовують в цьому документі, вираження "клітина", "клітинна лінія" і "клітинна культура" використовують взаємозамінно і всі такі позначення включають потомство. Таким чином, слова "трансформанти" і "трансформовані клітини" включають первинну клітину, що розглядається, і культури, отримані з неї без урахування числа перенесень. Також розуміють, що все потомство може бути не точно ідентичне по ДНК, що міститься внаслідок навмисних або

30 випадкових мутацій. Також включене мутантне потомство, яке має таку ж функцію або біологічну активність, по якій проводили скринінг вихідно трансформованої клітини. З контексту буде ясно, де потрібні чіткі позначення.

Як застосовують в цьому документі, "полімеразна ланцюгова реакція" або "ПЛР" стосується процедури або способу, в якому малі кількості конкретного фрагмента нуклеїнової кислоти, РНК

35 і/або ДНК, ампліфікують, як описано, наприклад, в патенті США № 4683195. Загалом, інформація про послідовності кінців області, що представляє інтерес, або за її межами повинна бути доступна, щоб можна було сконструювати олігонуклеотидні праймери; ці праймери повинні бути ідентичні або схожі по послідовності протилежним ланцюгам матриці, що підлягає ампліфікації. 5'-кінцеві нуклеотиди двох праймерів можуть співпадати з кінцями ампліфікованої речовини. ПЛР можна використати для ампліфікації конкретних послідовностей РНК, конкретних послідовностей ДНК з повною геномною ДНК і кДНК, транскрибованою із загальної клітинної РНК, послідовності бактеріофага або плазміди і т. д. Загалом, див. Mullis et al. (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich, ed., (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.) Як застосовують в цьому документі, ПЛР розглядають як один, але не єдиний, приклад способу

45 полімеразної реакції нуклеїнової кислоти для ампліфікації зразка нуклеїнової кислоти, що тестується, що включає застосування відомої нуклеїнової кислоти як праймера і полімерази нуклеїнової кислоти для ампліфікації або створення конкретного фрагмента нуклеїнової кислоти.

Як застосовують в цьому документі, термін "послідовність зародкової лінії" стосується послідовності неперебудованої послідовності ДНК імуноглобуліну. Можна використати будь-яке

50 відповідне джерело неперебудованої ДНК імуноглобуліну.

"Інгібітори" являють собою сполуки, які знижують, блокують, запобігають, затримують активацію, інактивують, десенсибілізують або придушують, наприклад, ген, білок, ліганд, рецептор або клітину. Інгібітор також можна визначити як композицію, яка знижує, блокує або

55 інтактивує конститутивну активність. "Антагоніст" являє собою сполуку, яка по дії протилежна агоністу. Антагоніст запобігає, знижує, інгібує або нейтралізує активність агоністу. Антагоніст також може запобігти, інгібувати або знизити конститутивну активність мішені, наприклад, рецептора-мішені, навіть коли агоніст не ідентифікований.

Щоб перевірити міру інгібування, наприклад, зразки або аналізи, що містять заданий,

60 наприклад, білок, ген, клітину або організм, лікують потенційним активуючим або інгібуючим

засобом і порівнюють з контрольними зразками без цього засобу. Контрольним зразкам, тобто які не лікували засобом, привласнюють значення відносної активності 100 %. Інгібування досягають, коли значення активності відносно контролю становить приблизно 90 % або менше, типово 85 % або менше, більш типово 80 % або менше, найбільш типово 75 % або менше, звичайно 70 % або менше, більш звичайно 65 % або менше, найбільш звичайно 60 % або менше, типово 55 % або менше, звичайно 50 % або менше, більш звичайно 45 % або менше, найбільш звичайно 40 % або менше, переважно 35 % або менше, більш переважно 30 % або менше, ще більш переважно 25 % або менше і найбільш переважно менше ніж 25 %.

Моніторинг кінцевих точок в інгібуванні можна здійснювати таким чином. Можна здійснювати моніторинг інгібування і відповідь на лікування, наприклад, клітини, фізіологічної текучої речовини, тканини, органу і суб'єкта тварини або людини, за допомогою кінцевої точки. Кінцева точка може містити кількість, що заздалегідь визначається, або процентну частку, наприклад, показники запалення, онкогенності або дегрануляції або секреції клітин, такі як вивільнення цитокіну, токсичного кисню або протеази. Кінцева точка може містити, наприклад, кількість потоку, що заздалегідь визначається, або транспорту іонів; клітинну міграцію; клітинну адгезію; клітинну проліферацію; потенціал метастазування; диференціацію клітин; і зміну фенотипу, наприклад, в експресії гена, пов'язаного із запаленням, апоптозом, трансформацією, клітинним циклом або метастазом (див., наприклад, Knight (2000) *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30:145-158; Hood and Cheresch (2002) *Nature Rev. Cancer* 2:91-100; Timme, et al. (2003) *Curr. Drug Targets* 4:251-261; Robbins and Itzkowitz (2002) *Med. Clin. North Am.* 86:1467-1495; Grady and Markowitz (2002) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3:101-128; Bauer, et al. (2001) *Glia* 36:235-243; Stanimirovic and Satoh (2000) *Brain Pathol.* 10:113-126)...

Кінцева точка інгібування як правило становить 75 % від контролю або менше, переважно 50 % від контролю або менше, більш переважно 25 % від контролю або менше і найбільш переважно 10 % від контролю або менше. Загалом, кінцева точка активації складає щонайменше 150 % від контролю, переважно щонайменше в два рази перевищує контроль, більш переважно щонайменше в чотири рази перевищує контроль і найбільш переважно щонайменше в 10 разів перевищує контроль.

"Специфічне" або "виборче" зв'язування, коли стосується ліганду/рецептору, антитілу/антигену або іншій парі, що зв'язується, означає реакцію зв'язування, по якій визначають присутність білка, наприклад, TSLP, в гетерогенній популяції білків і/або інших біологічних речовин. Таким чином, при позначених умовах, точно певний ліганд/антиген зв'язується з конкретним рецептором/антитілом і не зв'язується в значущій кількості з іншими білками, присутніми в зразку.

Антитіло або зв'язувальна композиція, отримана з антигенів'язувальної ділянки антитіла, за розглянутим способом зв'язується з його антигеном з афінністю, яка щонайменше в десять разів перевищує, більш переважно щонайменше в 20 разів перевищує і найбільш переважно щонайменше в 50 разів перевищує афінність з неродинними антигенами. У переважному варіанті здійснення антитіло повинно мати афінність, яка більше, ніж приблизно 10^9 л/моль, як визначають, наприклад, за допомогою аналізу Скетчарда (Munsen, et al. (1980) *Analyt. Biochem.* 107:220-239).

Як застосовують в цьому документі, термін "запальне порушення" стосується будь-якого захворювання або порушення, відмінного місцевим запаленням в місці пошкодження або інфекції і без обмеження містить алергічне запалення, аутоімунні захворювання і інші порушення, відмінні небажаним накопиченням імунних клітин в локальній ділянці тканини.

Як застосовують в цьому документі, термін "імуномодулюючий засіб" стосується природних або синтетичних засобів, які супресують або модулюють імунну відповідь. Імунна відповідь може являти собою гуморальну або клітинну відповідь. Імуномодулюючі засоби охоплюють імуносупресорні або протизапальні засоби.

"Імуносупресорні засоби", "імуносупресорні лікарські засоби" або "імуносупресанти", як застосовують в цьому документі, являють собою терапевтичні засоби, які використовують в імуносупресорній терапії для того, щоб інгібувати або запобігти активності імунної системи. Клінічно їх використовують для запобігання відторгненню трансплантованих органів і тканин (наприклад, кісткового мозку, серця, нирки, легені) і/або в лікуванні аутоімунних захворювань або захворювань, які ймовірно усього мають аутоімунне походження (наприклад, ревматоїдний артрит, міастенія гравіс, системний червоний вовчак, виразковий коліт, розсіяний склероз). Імуносупресорні лікарські засоби можна розділити на чотири групи: глюкокортикоїдні цитостатики; антитіла (включаючи модифікатори біологічної відповіді або DMARD); лікарські засоби, діючі на імунофіліні; інші лікарські засоби, включаючи відомі хіміотерапевтичні засоби, що використовуються в лікуванні проліферативних порушень. Зокрема, при розсіяному склерозі

антитіла за даним винаходом можна вводити в поєднанні з новим класом мієлінів'язувальних білок-подібних терапевтичних засобів, відомих як копаксони.

"Протизапальні засоби" або "протизапальні лікарські засоби" використовують для позначення як стероїдних, так і нестероїдних терапевтичних засобів. Стероїди, також відомі як кортикостероїди, являють собою лікарські засоби, які близько походять до кортизолу, гормону, який в природі продукують надниркові залози. Стероїди використовують як основне лікування для певних запальних станів, таких як: системний васкуліт (запалення кровонесних судин); і міозит (запалення м'язів). Стероїди також можна використовувати вибірково для лікування запальних станів, таких як: ревматоїдний артрит (хронічний запальний артрит, що виявляється в суглобах на обох сторонах тіла); системний червоний вовчак (генералізований стан, зумовлений аномальною функцією імунної системи); синдром Шегрена (хронічне порушення, яке обумовлює сухість очей і сухість у роті).

Нестероїдні протизапальні лікарські засоби, що звичайно скорочуються до НПЗЗ, являють собою лікарські засоби з анагетичним, жарознижувачим і протизапальними ефектами - вони знижують біль, жар і запалення. Термін "нестероїдний" використовують для того, щоб відрізнити ці лікарські засоби від стероїдів, які (серед широкого діапазону інших ефектів) мають схожу придушуючу ейкозаноїди протизапальну дію. Як правило, НПЗЗ показані для полегшення симптомів наступних станів: ревматоїдний артрит; остеоартрит; запальні артропатії (наприклад, анкілозуючий спондиліт, псоріатичний артрит, синдром Рейтера); гостра кишка; дисменорея; метастатичний біль в кістках; головний біль і мігрень; післяопераційний біль; біль від легкого до помірного внаслідок запалення і пошкодження тканини; пірексія; і ниркова коліка. НПЗЗ включають саліцилати, арилалконові кислоти, 2-арилпропанові кислоти (профени), N-арилантранілові кислоти (фенамові кислоти), оксиками, коксиди (виборчі інгібітори ЦОГ-2), сульфонаміди, диклофенак, дифлунізал, етодолак, фенпрофен, флурбіпрофен, ібупрофен, індометацин, кетопрофен, кеторолак, мефенамова кислота, мелоксикам, набуметон, напроксен, оксипрозин, піроксикам, салсалат, суліндак або толметин.

II. Загальні зведення

Даний винахід стосується сконструйованих антитіл проти TSLP і їх застосуванню для лікування запальних і, зокрема, алергійних запальних порушень. У переважному варіанті здійснення запальне порушення являє собою астму. У переважному варіанті здійснення алергійне запальне порушення являє собою алергійний риносинусит, алергічну астму, алергійний кон'юнктивіт або атопічний дерматит. Даний винахід також стосується сконструйованих антитіл проти TSLP для лікування фіброзу, запального захворювання кишечника або лімфоми Ходжкіна.

Як використовують у даному документі, термін "TSLP" включає варіанти, ізоформи, гомологи, ортологи і паралоги TSLP. Амінокислотна послідовність TSLP людини приведена в SEQ ID NO: 4 міжнародної публікації № WO 00/17362.

III. Сконструйовані антитіла зі специфічністю до TSLP за винаходом

Винахід стосується сконструйованих антитіл проти TSLP, що містить точно визначені області CDR.

Способи рекомбінантного конструювання антитіл описані, наприклад, авторами Boss et al. (патент США № 4816397), Cabilly et al. (патент США № 4816567), Law et al. (публікація європейської патентної заявки № 438310) і Winter (публікація європейської патентної заявки № 239400).

Сконструйовані антитіла за винаходом включають ті, у яких виконані модифікації в каркасних залишках у V_H і/або V_L , наприклад, для того, щоб удосконалити властивості антитіла. Типово такі модифікації каркаса виконують для зниження імуногенності антитіла. Наприклад, один підхід полягає в "зворотному мутуванні" одного або декількох каркасних залишків у відповідну послідовність зародкової лінії. Більш конкретно, антитіло, що піддалося соматичній мутації, може містити каркасні залишки, що відрізняються від послідовності зародкової лінії, з якої отримане антитіло. Такі залишки можна ідентифікувати за допомогою порівняння каркасних послідовностей антитіла з послідовностями зародкової лінії, з якої отримане антитіло.

В інший тип модифікації каркаса залучене мутування одного або декількох залишків усередині каркасної області або навіть усередині однієї або декількох областей CDR, щоб видалити Т-клітинні епітопи, тим самим знижуючи можливу імуногенність антитіла. Цей підхід також позначають як "деімунізація" і він описаний більш докладно в публікації патенту США № 20030153043.

Крім того або як альтернативу модифікаціям, виконуваним усередині каркаса або областей CDR, антитіла за винаходом можна сконструювати для того, щоб вони містили модифікації усередині Fc-області, типово для того, щоб змінити одне або кілька функціональних

властивостей антитіла, таких як час напівжиття в сироватці, зв'язування комплементу, зв'язування Fc рецептора і/або антиген-залежна клітинна цитотоксичність. Крім того, антитіло за винаходом можна модифікувати хімічно (наприклад, до антитіла можна приєднати один або кілька хімічних фрагментів) або можна модифікувати для того, щоб змінити його глікозилювання, також для того, щоб змінити одну або кілька функціональних властивостей антитіла. Кожний з цих варіантів здійснення описаний більш докладно нижче. Нумерація залишків у Fc-області являє собою таку по індексу EU Kabat'a.

В одному з варіантів здійснення антитіло являє собою антитіло ізотипу IgG4, що містить мутацію серину в пролін у положенні, що відповідає положенню 228 (S228P; індекс EU) у шарнірній області константної області важкого ланцюга. Повідомлялося, що ця мутація усуває гетерогенність дисульфідних містків між важкими ланцюгами в шарнірній області (Angal et al. вище; положення 241 на основі системи нумерації по Kabat).

В одному з варіантів здійснення шарнірну область CH1 модифікують так, що змінюють число залишків цистеїну в шарнірній області, наприклад, збільшують або зменшують. Цей підхід додатково описаний у патенті США № 5677425. Число залишків цистеїну в шарнірній області CH1 змінюють, наприклад, для того, щоб полегшити зборку легкого і важкого ланцюгів або для того, щоб підвищити або понизити стабільність антитіла.

В іншому варіанті здійснення в Fc шарнірну область антитіла вводять мутації для зменшення біологічного часу напівжиття антитіла. Більш конкретно, мутації однієї чи декількох амінокислот вводять в область контакту домену CH2-CH3 Fc-шарнірні фрагменти так, що антитіло має ослаблене зв'язування зі стафілококовим білком A (SpA) стосовно зв'язування SpA нативного Fc-шарнірного домену. Цей підхід описаний більш докладно в патенті США № 6165745.

В іншому варіанті здійснення антитіло модифікують для того, щоб збільшити його біологічний час напівжиття. Можливі різні підходи. Наприклад, можна вводити одну або кілька наступних мутацій: T252L, T254S, T256F, як описано в патенті США № 6277375. Альтернативно, для збільшення біологічного часу напівжиття антитіло можна змінити усередині області CH1 або CL, щоб воно містило епітоп зв'язування рецептора порятунку, запозичений із двох петель домену CH2 Fc-області IgG, як описано в патентах США №№ 5869046 і 6121022.

В інших варіантах здійснення Fc-область змінюють за допомогою заміни щонайменше одного амінокислотного залишку на інший амінокислотний залишок для того, щоб змінити ефекторну функцію(ї) антитіла. Наприклад, одну або кілька амінокислот, вибраних з амінокислотних залишків 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 і 322 можна замінити на інший амінокислотний залишок так, щоб антитіло мало змінену афінність до ефекторного ліганду, але зберігало антигенозв'язувальну здатність батьківського антитіла. Ефекторний ліганд, афінність до якого змінюють, може являти собою, наприклад, Fc або рецептор C1 компонент комплементу. Цей підхід описаний більш докладно в патентах США №№ 5624821 і 5648260.

В іншому прикладі одну або кілька амінокислот, вибраних з амінокислотних залишків 329, 331 і 322, можна замінити на інший амінокислотний залишок так, щоб антитіло мало змінене зв'язування C1q і/або зниженою або усунутою комплемент-залежною цитотоксичністю (CDC). Цей підхід описаний більш докладно в патенті США № 6194551.

В іншому прикладі один або кілька амінокислотних залишків усередині амінокислотних положень 231 і 239 змінюють для того, щоб тим самим змінити здатність антитіла зв'язувати комплемент. Цей підхід додатково описаний у публікації PCT WO 94/29351.

У ще одному іншому прикладі Fc-область модифікують для того, щоб підвищити здатність антитіла опосередковувати антитіло-залежну клітинну цитотоксичність (ADCC) і/або для того, щоб підвищити афінність антитіла до рецептора Fcγ за допомогою модифікації однієї або декількох амінокислот у наступних положеннях: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 або 439. Цей підхід додатково описаний у публікації PCT WO 00/42072. Крім того, картовані сайти зв'язування на IgG1 людини для FcγRI, FcγRII, FcγRIII і FcRn і описані варіанти з поліпшеним зв'язуванням (див. Shields et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Показано, що конкретні мутації в положеннях 256, 290, 298, 333, 334 і 339 поліпшують зв'язування з FcγRIII. Додатково, наступні комбінаторні мутанти показують поліпшене зв'язування FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A и S298A/E333A/K334A.

В іншому варіанті здійснення глікозилювання антитіла модифікують або змінюють для того, щоб видалити або додати молекули вуглеводів до антитіл. Наприклад, можна створити аглікозилизоване антитіло (тобто, антитіло без глікозилювання). Глікозилювання можна змінити,

наприклад, для того, щоб підвищити афінність антитіла до антигену. Такі модифікації вуглеводів можна виконувати, наприклад, за допомогою зміни одного або декількох сайтів глікозилювання всередині послідовності антитіла. Наприклад, можна створити одну або кілька замін амінокислот, що ведуть до усунення однієї або декількох ділянок глікозилювання каркаса варіабельної області для того, щоб тим самим усунути глікозилювання в цьому сайті. Таке аглікозилювання може підвищувати афінність антитіла до антигену. Див., наприклад, патенти США №№ 5714350 і 6350861.

Додатково або альтернативно, можна створити антитіло, що має змінений тип глікозилювання, таке як гіпофукозиловане антитіло, що містить зменшені кількості залишків фукози, або антитіло, що містить збільшені відгалужувані структури GlcNac. Продемонстровано, що такі змінні патерни глікозилювання підвищують здатність антитіл до ADCC. Такі модифікації вуглеводів можна виконувати, наприклад, за допомогою експресії антитіла в клітині-хазяїні зі змінним механізмом глікозилювання. Клітини зі змінним механізмом глікозилювання описані в даній галузі і їх можна використовувати як клітини-хазяї, в яких експресують рекомбінантні антитіла за винаходом, щоб тим самим одержати антитіло зі змінним глікозилюванням. Наприклад, клітинні лінії Ms704, Ms705 і Ms709 не містять ген фукозилтрансферази, FUT8 ($\alpha(1,6)$ -фукозилтрансферази), так що вуглеводи на антитілах, експресованих у клітинних лініях Ms704, Ms705 і Ms709, не містять фукозу. Клітинні лінії Ms704, Ms705, і Ms709 FUT8-/- створені за допомогою націленого руйнування гена FUT8 у клітинах CHO/DG44 із застосуванням двох векторів заміщення (див. публікацію патенту США № 20040110704 і Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). Як інший приклад у EP 1176195 описана клітинна лінія з функціонально порушеним геном FUT8, що кодує фукозилтрансферазу, так що антитіла, експресовані в такій клітинній лінії, виявляють гіпофукозилювання за допомогою зменшення або усунення ферменту, зв'язаного з $\alpha(1,6)$ -зв'язком. У EP 1176195 також описана клітинна лінія людини, що має низьку ферментативну активність по додаванню фукози до N-ацетилглюкозаміну, що зв'язується з Fc-областю антитіла або не має ферментативну активність, наприклад, лінія клітин мієломи щура YB2/0 (ATCC CRL 1662). У публікації PCT WO 03/035835 описаний варіант клітинної лінії CHO, клітини Lec13, зі зниженою здатністю прикріплювати фукозу до зв'язаного з Asn(297) вуглеводам, що також веде до гіпофукозилювання антитіла, експресованого в цій клітині-хазяїні (див. також Shields et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Антитіла з модифікованим профілем глікозилювання також можна продукувати у курячих яйцях, як описано в публікації PCT WO 06/089231. Альтернативно, антитіла з модифікованим профілем глікозилювання можна продукувати у клітинах рослин, таких як *Lemna*. У публікації PCT WO 99/54342 описані клітинні лінії, сконструйовані для експресії глікозилтрансфераз, що модифікують глікопротеїни (наприклад, $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозамінілтрансферази III (GnTIII)) так, що антитіла, експресовані в сконструйованих клітинних лініях, виявляють збільшені відгалужувані структури GlcNac, що веде до підвищеної ADCC активності антитіл (також див. Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Альтернативно, залишки фукози в антитілах можна відщеплювати із застосуванням ферменту фукозидази; наприклад, фукозидаза α -L-фукозидаза усуває залишки фукози з антитіл (Tarentino et al. (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Інша модифікація антитіл у даному документі, що передбачена цим розкриттям, являє собою пегілювання. Антитіло можна пегілювати, наприклад, для того, щоб підвищити біологічний час напівжиття антитіла (наприклад, у сироватці). Щоб пегілювати антитіло, типово проводять реакцію антитіла або його фрагмента з поліетиленгліколем (PEG), таким як реакційноздатне складноефірне або альдегідне похідне PEG в умовах, в яких одна або кілька груп PEG прикріплюються до антитіла або фрагменту антитіла. Переважно, пегілювання здійснюють через реакцію ацилювання або реакцію алкілювання з реакційноздатною молекулою PEG (або аналогічним реакційноздатним водорозчинним полімером). Як застосовують у даному документі, термін "поліетиленгліколь" призначений для того, щоб охоплювати будь-які форми PEG, що використовують для одержання похідних інших білків, такі як моно(C₁-C₁₀)алкокси- або арилоксиполіетиленгліколь або поліетиленглікольмалеїмід. У визначених варіантах здійснення антитіло, що підлягає пегілюванню, являє собою аглікозиловане антитіло. Способи пегілювання білків відомі в даній галузі і їх можна застосовувати до антитіл за винаходом. Див., наприклад, EP 0154316 і EP 0401384.

Варіанти амінокислотної послідовності гуманізованого антитіла проти TSLP за винаходом можна одержувати за допомогою введення відповідних нуклеотидних замін у ДНК гуманізованого антитіла проти TSLP або за допомогою синтезу пептидів. Такі варіанти включають, наприклад, делеції і/або інсерції і/або заміни залишків усередині амінокислотних послідовностей, приведених для гуманізованих антитіл проти TSLP, що розкриті і заявлені в

даному документі. Будь-яке поєднання делеції, інсерції і заміни можна виконати для того, щоб прийти до кінцевої конструкції, за умови, що кінцева конструкція має бажані характеристики. Як зазначено вище, зміни амінокислот також можуть змінювати посттрансляційні процеси гуманізованого антитіла проти TSLP, такі як зміна числа або положення ділянок глікозилювання.

Ефективний спосіб ідентифікації визначених залишків або областей поліпептиду гуманізованого антитіла проти TSLP, що являють собою кращі положення для мутагенезу, називають "скануючим аланіновим мутагенезом", як описано авторами Cunningham and Wells (1989) Science 244: 1081-1085. Тут ідентифікують залишок або групу залишків мішені (наприклад, заряджені залишки, такі як Arg, Asp, His, Lys і Glu) і замінюють нейтральними або негативно зарядженими амінокислотами (найбільш переважно аланіном або поліаланіном), щоб впливати на взаємодію амінокислот з антигеном TSLP. Потім амінокислотні залишки, що демонструють функціональну чутливість до замін, уточнюють за допомогою введення додаткових або інших варіантів у сайти або заміни для них. Таким чином, незважаючи на те, що попередньо визначають сайт для введення варіації амінокислотної послідовності, властивості мутації *per se* не потрібно визначати попередньо. Наприклад, щоб аналізувати характеристики мутації в заданому сайті, у кодоні-мішені або області-мішені проводять скануючий аланіновий або випадковий мутагенез і здійснюють скринінг експресованих гуманізованих варіантів антитіл проти TSLP на бажану активність.

Інсерції амінокислотної послідовності включають N- і/або C-кінцеві злиття, що варіюють по довжині від одного залишку до поліпептидів, що містять сотні або більше залишків, а також інсерції одного або декількох амінокислотних залишків усередині послідовності. Приклади кінцевих інсерцій включають гуманізоване антитіло проти TSLP з N-кінцевим залишком метіоніну або антитіло, злите з епітопною міткою. Інші варіанти інсерцій у молекулі гуманізованого антитіла проти TSLP включають злиття N- або C-кінця гуманізованого антитіла проти TSLP з ферментом або поліпептидом, що збільшує час напівжиття в сироватці антитіла.

Інший тип варіанта являє собою варіант із заміною амінокислоти. Ці варіанти мають щонайменше один вилучений амінокислотний залишок у молекулі гуманізованого антитіла проти TSLP і інший залишок, вставлений замість нього. Сайти, що представляють найбільший інтерес для заміняючого мутагенезу, включають гіперваріабельні петлі, але зміни FR також передбачені. Залишки гіперваріабельної області або залишки FR, що беруть участь у зв'язуванні антигену, як правило, замінюють відносно консервативним чином.

Інший тип варіанта амінокислоти являє собою заміну залишків для того, щоб забезпечити вищу хімічну стабільність кінцевого гуманізованого антитіла.

У визначених варіантах здійснення буде бажано в такий спосіб змінити визначені амінокислоти, що містять виступаючі бічні ланцюги, на інший амінокислотний залишок для того, щоб забезпечити вищу хімічну стабільність кінцевого антитіла. Наприклад, залишок аспарагіну (Asn) можна змінити на Gln або Ala, щоб знизити можливість утворення ізоаспартату в будь-якій послідовності Asn-Gly усередині CDR. Схожа проблема може виникнути в послідовності Asp-Gly. Reissner and Aswad (2003) Cell. Mol. Life Sci. 60:1281. Утворення ізоаспартату може послабляти або цілком усувати зв'язування антитіла з його антигеном-мішенню. Див., Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116:731 на 734. В одному з варіантів здійснення аспарагін змінюють на глутамін* (Gln). Також може бути бажаним змінити амінокислоту, суміжну з залишком аспарагіну (Asn) або глутаміну (Gln), щоб знизити імовірність дезамідування, що виникає в більш значній мірі, коли маленькі амінокислоти виявляються суміжними з аспарагіном або глутаміном. Див. Bischoff & Kolbe (1994) J. Chromatog. 662:261. Крім того, будь-які залишки метіоніну (типово Met, доступний для розчинника) у CDR можна змінювати на Lys, Leu, Ala або Phe для того, щоб знизити можливість того, що сірка метіоніну буде окислятися, що може знизити афінність зв'язування з антигеном, а також вносить внесок у молекулярну гетерогенність у кінцевому препараті антитіла. Id. В одному з варіантів здійснення метіонін змінюють на аланін (Ala). Додатково, для того щоб запобігти або мінімізувати потенційні розщеплювані пептидні зв'язку Asn-Pro, може бути бажано змінити будь-які комбінації Asn-Pro, знайдені в CDR на Gln-Pro, Ala-Pro або Asn-Ala. Згодом проводять скринінг антитіл з такими замінами, щоб гарантувати, що заміни не знижують афінність зв'язування з TSLP або іншу бажану біологічну активність до неприйнятних рівнів.

Таблиця 2

Зразкові стабілізуючі варіанти CDR

Залишок CDR	Послідовність стабілізуючого варіанта
Asn-Gly (N-G)	Gln-Gly, Ala-Gly або Asn-Ala (Q-G), (A-G) або (N-A)
Asp-Gly (D-G)	Glu-Gly, Ala-Gly або Asp-Ala (E-G), (A-G) або (D-A)
Met (типово доступний для розчинника) (M)	Lys, Leu, Ala або Phe (K), (L), (A) або (F)
Asn (N)	Gln або Ala (Q) або (A)
Asn-Pro (N-P)	Gln-Pro, Ala-Pro або Asn-Ala (Q-P), (A-P) або (N-A)

Крім того, залишки метіоніну в CDR гризунів можна змінювати для зниження імовірності того, що сірка метіоніну буде окислятися, що може знизити афінність зв'язування з антигеном, а також вносить внесок у молекулярну гетерогенність у кінцевому препараті антитіла. Id. В одному з варіантів здійснення метіонін змінюють на аланін (A). Згодом здійснюють скринінг антитіл з такими замінами, щоб гарантувати, що заміни не знизили афінність зв'язування з TSLP до неприйнятних рівнів.

Молекули нуклеїнової кислоти, що кодують варіанти амінокислотної послідовності гуманізованого антитіла зі специфічністю до TSLP, одержують за допомогою різних відомих у даній галузі способів. Ці способи включають як необмежуючі приклади виділення з природного джерела (у випадку варіантів, що зустрічаються в природі, амінокислотної послідовності) або одержання за допомогою опосередкованого олігонуклеотидами (або сайт-направленого) мутагенезу, ПЛР мутагенезу і касетного мутагенезу раніше отриманого варіанта або неваріантної версії гуманізованого антитіла проти TSLP.

Звичайно варіанти амінокислотної послідовності гуманізованого антитіла проти TSLP повинні мати амінокислотну послідовність, що має щонайменше 97 % ідентичність амінокислотних послідовностей з вихідними амінокислотними послідовностями одного з важкого або легкого ланцюга гуманізованого антитіла, більш переважно щонайменше 98 %, більш переважно щонайменше 99 %. Ідентичність або гомологію у відношенні цієї послідовності визначають у даному документі як процентну частку амінокислотних залишків у розглянутій послідовності, що ідентичні залишкам гуманізованого антитіла проти TSLP, після вирівнювання послідовностей і введення пропусків, у разі потреби, щоб досягти максимального відсотка ідентичності послідовностей, і без обліку яких-небудь консервативних замін як частину ідентичності послідовностей. N-кінцеві, C-кінцеві або внутрішні розширення, делеції або інсерції в послідовності антитіла не слід розглядати як такі, що впливають на ідентичність або гомологію послідовностей.

Гуманізоване антитіло можна вибирати з будь-якого класу імуноглобулінів, включаючи IgM, IgG, IgD, IgA і IgE. Переважне антитіло являє собою антитіло IgG. Можна використовувати будь-який ізотип IgG, включаючи IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Також передбачені варіанти ізотипів IgG. Гуманізоване антитіло може містити послідовності з більш ніж одного класу або ізотипу. Оптимізації необхідних послідовностей константного домену для створення бажаної біологічної активності легко досягають за допомогою скринінгу антитіл у біологічних аналізах, описаних нижче.

Аналогічним чином, у композиціях і способах у даному документі можна використовувати будь-який клас легкого ланцюга. Зокрема, κ, λ або їхні варіанти можна використовувати в даних композиціях і способах.

Можна використовувати будь-яку придатну частину послідовностей CDR з антитіла, що не належить людині. Можна здійснювати мутагенез послідовностей CDR за допомогою заміни, інсерції або делеції щонайменше одного залишку так, щоб послідовність CDR відрізнялася від використовуваних послідовностей антитіла, що належать і не належать людині. Передбачено, що такі мутації повинні бути мінімальними. Типово, щонайменше 95 % залишків гуманізованого антитіла повинні відповідати таким залишкам CDR, що не належать людині і найбільш переважно більш ніж 97 %.

Можна використовувати будь-яку придатну частину послідовностей FR з антитіла людини. Можна здійснювати мутагенез послідовностей FR за допомогою заміни, інсерції або делеції щонайменше одного залишку так, щоб послідовність FR відрізнялася від використовуваних

послідовностей антитіл, що належать і не належать людині. Передбачено, що такі мутації повинні бути мінімальними. Типово, щонайменше 75 % залишків гуманізованого антитіла повинні відповідати таким залишкам FR людини, більш звичайно 90 % і найбільше переважно більш ніж 95 %.

5 Залишки CDR і FR визначають відповідно до стандартного визначення послідовностей по Kabat. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda Md. (1987).

У переважному варіанті здійснення зв'язувальна композиція відповідно до винаходу містить одну або декілька з наступних послідовностей:

- 10 - послідовність CDR-H1 GYIFTDYAMH (SEQ ID NO: 1).
- послідовність CDR-H2 TFIPLDTSYQAQKFQG (SEQ ID NO: 2).
- послідовність CDR-H3 MGVTHSYVMDA (SEQ ID NO: 3).
- послідовність CDR-L1 RASQPISISVH (SEQ ID NO: 4).
- 15 - послідовність CDR-L2 FASQSI (SEQ ID NO: 5).
- послідовність CDR-L3 QQTFSLPYT (SEQ ID NO: 6).
- амінокислотна послідовність варіабельного важкого ланцюга, наведена у SEQ ID NO: 7.
- амінокислотна послідовність варіабельного легкого ланцюга, наведена у SEQ ID NO: 8.
- послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує варіабельний важкий ланцюг, наведений у SEQ ID NO: 9.
- 20 - послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує варіабельний легкий ланцюг, наведений у SEQ ID NO: 10.
- амінокислотна послідовність важкого ланцюга, наведена в SEQ ID NO: 11. Ця послідовність може додатково містити наступну лідерну послідовність: MAVLGLLFCLVTFPSCVLS (SEQ ID NO: 15).
- 25 - амінокислотна послідовність легкого ланцюга, приведена в SEQ ID NO: 12. Ця послідовність може додатково містити наступну лідерну послідовність: MAPVQLLGLLVFLPAMRC (SEQ ID NO: 16).

- послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує важкий ланцюг, наведена в SEQ ID NO: 13. Ця послідовність може додатково містити послідовність, що кодує лідерну послідовність, переважно наступну лідерну послідовність: MAVLGLLFCLVTFPSCVLS (SEQ ID NO: 15).
- 30 - послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує легкий ланцюг, наведена в SEQ ID NO: 14. Ця послідовність може додатково містити послідовність, що кодує лідерну послідовність, переважно наступну лідерну послідовність: MAPVQLLGLLVFLPAMRC (SEQ ID NO: 16).

- Наприклад, даний винахід стосується ізолюваного антитіла або його антигенв'язувального фрагменту, що містить легкий ланцюг імуноглобуліну, який містить CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3 (як викладено вище), і важкий ланцюг імуноглобуліну, що містить CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 (як викладено вище). Даний винахід також стосується ізолюваного антитіла або його антигенв'язувального фрагменту, що містить варіабельну область легкого ланцюга імуноглобуліну, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 8 або 12, і варіабельну область важкого ланцюга імуноглобуліну, що містить амінокислотну послідовність, наведену в SEQ ID NO: 7 і 11 (наприклад, SEQ ID NO: 7, спарена з SEQ ID NO: 8; або SEQ ID NO: 11, спарена з SEQ ID NO: 12). В одному з варіантів здійснення винаходу таке антитіло або фрагмент можна зв'язати з константним доменом імуноглобуліну, такого як IgG (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4). Його фармацевтична композиція, що містить зазначене антитіло або
- 45 фрагмент і фармацевтично прийнятний носій, також є частиною даного винаходу.

- У деяких варіантах здійснення різні константні домени можна додавати до гуманізованих областей V_L і V_H , наданих у даному документі. Наприклад, якщо конкретне передбачуване застосування антитіла (або фрагмента) за даним винаходом полягало в тому, щоб викликати змінені ефекторні функції, можна використовувати константний домен важкого ланцюга, відмінний від IgG1. Незважаючи на те, що антитіла IgG1 забезпечують тривалий час напівжиття і ефекторні функції, такі як активація комплементу й антитілозалежна клітинна цитотоксичність, такі активності можуть не бути бажаними для всіх застосувань антитіла. У таких випадках можна використовувати, наприклад, константний домен IgG4.

IV. Кон'югати антитіл

- 55 Зв'язувальні сполуки за винаходом, наприклад, антитіло або фрагменти антитіл за винаходом, також можна кон'югувати з хімічним фрагментом. Хімічний фрагмент може являти собою, *inter alia*, полімер, радіонуклід або цитотоксичний фактор. Переважно хімічний фрагмент являє собою полімер, що збільшує час напівжиття молекули антитіла в організмі суб'єкта. Придатні полімери включають як необмежуючі приклади поліетиленгліколь (PEG) (наприклад,
- 60 PEG з молекулярною масою 2 кДа, 5 кДа, 10 кДа, 12 кДа, 20 кДа, 30 кДа або 40 кДа), декстран і

монометоксиполіетиленгліколь (mPEG). Lee, et al, (1999) (Bioconj. Chem. 10:973-981) розкривають одноланцюжкові антитіла, кон'юговані з PEG. Wen, et al., (2001) (Bioconj. Chem. 12:545-553) розкривають антитіла, кон'юговані з PEG, що приєднані до хелатору радіометалу (діетилентриамінпентаоцтової кислоти (ДТРА)).

5 Антитіла і фрагменти антитіл за винаходом також можна кон'югувати з мітками, такими як ^{99}Tc , ^{90}Y , ^{111}In , ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , ^{131}I , ^{11}C , ^{15}O , ^{13}N , ^{18}F , ^{35}S , ^{51}Cr , ^{57}To , ^{226}Ra , ^{60}Co , ^{59}Fe , ^{57}Se , ^{152}Eu , ^{67}Cu , ^{217}Ci , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd , ^{234}Th і ^{40}K , ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{52}Tr і ^{56}Fe .

Антитіла і фрагменти антитіл за винаходом також можна кон'югувати із флуоресцентними або хемілюмінесцентними мітками, включаючи флуорофори, такі як рідкоземельні хелати, флуоресцеїн і його похідні, родамін і його похідні, ізотіоціанат, фікоеритрин, фікоціанін, алофікоціанін, о-фталальдегід, флуорескамін, ^{152}Eu , дансил, умбеліферон, люциферин, люміналову мітку, ізолюміналову мітку, мітку ароматичного ефіру акридинію, імідазолову мітку, мітку солі акридинію, оксалатну ефірну мітку, мітку екворин, 2,3-дигідрофталазіндіони, біотин/авідин, спінові мітки і стабільні вільні радикали.

15 Молекули антитіл також можна кон'югувати з цитотоксичним фактором, таким як токсин дифтерії, ланцюг А екзотоксину *Pseudomonas aeruginosa*, ланцюг А рицину, ланцюг А абрину, ланцюг А модесину, α -сарцин, білки і сполуки *Aleurites fordii* (наприклад, жирні кислоти), діантинові білки, білки *Phytolacca americana* PAPI, PAPII і PAP-S, інгібітор момордики харантської, курцин, кротин, інгібітор *Saponaria officinalis*, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин і еноміцин.

20 Можна використовувати будь-який відомий у даній галузі спосіб одержання кон'югатів молекул антитіл за винаходом з різними фрагментами, включаючи ті способи, що описані авторами Hunter, et al, (1962) Nature 144:945; David, et al, (1974) Biochemistry 13:1014; Pain, et al, (1981) J. Immunol. Meth. 40:219; і Nygren, J., (1982) Histochem. and Cytochem. 30:407. Способи одержання кон'югатів антитіл є стандартними і дуже добре відомі в даній галузі.

25 В інших варіантах здійснення різні константні домени можна приєднувати до гуманізованих областей V_L і V_H , отриманим з CDR, передбачених у даному документі. Наприклад, якщо конкретне передбачуване застосування антитіла (або фрагмента) за даним винаходом полягає в тому, щоб викликати змінені ефекторні функції, можна використовувати константний домен важкого ланцюга, відмінний від IgG1, або можна використовувати гібрид IgG1/IgG4.

Незважаючи на те, що антитіла IgG1 забезпечують тривалий час напівжиття і ефекторні функції, такі як активація комплемент і антитілозалежна клітинна цитотоксичність, такі активності можуть не бути бажаними для всіх застосувань антитіла. У таких випадках можна використовувати, наприклад, константний домен IgG4. У hu Mab8D5, константний домен IgG4 відрізняється від нативного константного домену IgG4 людини (Swiss-Prot № доступу P01861.1, розкриття якого, таким чином, включено за допомогою посилання) у положенні 108, де нативний Ser108 замінений на Pro, для того, щоб запобігти міжланцюговому дисульфідному зв'язку між Cys106 і Cys109, що може перешкоджати формуванню правильного міжланцюгового дисульфідного зв'язку. Див. Angal et al (1993) Mol Immunol 30:105.

40 V. Біологічна активність зв'язувальних сполук за винаходом

Можна здійснювати скринінг зв'язувальних сполук, що мають характеристики, ідентифіковані в даному документі як бажані у гуманізованому антитілі проти TSLP, на інгібуючу біологічну активність *in vitro* або на придатну афінність зв'язування.

45 Афінності антитіл (наприклад, до TSLP людини) можна визначати із застосуванням стандартного аналізу. Переважними гуманізованими антитілами є ті, які зв'язують TSLP людини зі значенням K_D не більше ніж приблизно 1×10^{-7} M; переважно не більше ніж приблизно 1×10^{-8} M; більш переважно не більше ніж приблизно 1×10^{-9} M; і найбільш переважно не більше ніж приблизно 1×10^{-10} M.

50 Антитіла і їхні фрагменти, які можна використовувати в даних композиціях і способах, є біологічно активними антитілами і фрагментами. Як застосовують у даному документі, термін "біологічно активний" стосується антитіла або фрагмента антитіла, що здатні зв'язувати бажані антигенні епітопи і виявляти біологічний ефект безпосередньо або опосередковано. Типово, ці ефекти виникають у результаті нездатності TSLP зв'язуватися зі своїм рецептором. В одному з варіантів здійснення антитіло і його фрагменти, які можна використовувати в даних композиціях і способах, інгібують: індувану hTSLP проліферацію клітинної лінії Baf-3, трансфікованої hTSLP-рецептором і IL-7R α ; індувану hTSLP експресію люциферази клітинною лінією Baf-3, трансфікованої TSLP-рецептором і люциферазною репортерною системою; індувану hTSLP секрецію TARC первинними моноцитами людини, ізольованими з PBMC; і індукцію диференціації Th2.

Як застосовують у даному документі, термін "специфічне" стосується виборчого зв'язування антитіла з епітопом антигену-мішені. Антитіла можна тестувати на специфічність зв'язування за допомогою порівняння зв'язування з TSLP зі зв'язуванням з невідповідним антигеном або сумішшю антигенів при заданій сукупності умов. Якщо антитіло зв'язується з TSLP щонайменше в 10 і переважно в 20 або в 50 разів сильніше, ніж з невідповідним антигеном або сумішшю антигенів, тоді його вважають специфічним. Антитіло, що "специфічно зв'язується" з TSLP, не зв'язується з білками, що не містять отримані з TSLP послідовності, тобто "специфічність", як застосовують у даному документі, стосується специфічності до TSLP і не до якої-небудь іншої послідовності, що може бути присутньою у розглянутому білку. Наприклад, як застосовують у даному документі, антитіло, що "специфічно зв'язується" з TSLP, типово повинно зв'язуватися з FLAG-h TSLP, який являє собою злитий білок, що містить TSLP і пептидну мітку FLAG®, але не повинно зв'язуватися з пептидною міткою FLAG® окремо або коли вона злита з білком, відмінним від TSLP.

VI. Фармацевтичні композиції

Для одержання фармацевтичних або стерильних композицій, антитіло або його фрагмент змішують з фармацевтично прийнятним носієм або ексципієнтом, див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences і U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). Сполуки терапевтичних і діагностичних засобів можна одержувати за допомогою змішування з фізіологічно прийнятними носіями, ексципієнтами або стабілізаторами у формі, наприклад, ліофілізованих порошків, суспензій, водних розчинів або суспензій (див., наприклад, Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, NY).

Токсичність і терапевтична ефективність композицій антитіл, що вводяться окремо або в поєднанні з імуносупресорним засобом, можна визначити за допомогою стандартних фармацевтичних процедур у клітинних культурах або на експериментальних тваринах, наприклад, для визначення LD₅₀ (летальної дози для 50 % популяції) і ED₅₀ (терапевтично ефективної дози в 50 % популяції). Відношення доз між токсичним і терапевтичним ефектами являє собою терапевтичний індекс і його можна виразити у вигляді відношення між LD₅₀ і ED₅₀. Антитіла, що мають високі терапевтичні індекси, є переважними. Дані, отримані з аналізів клітинних культур і досліджень на тваринах, можна використовувати при складанні діапазону доз для застосування в людини. Доза таких сполук переважно лежить усередині діапазону циркулюючих концентрацій, що містить ED₅₀ з невеликою або нульовою токсичністю. Доза може варіювати усередині цього діапазону в залежності від застосовуваної лікарської форми і використововуваного шляху введення.

Придатні шляхи введення включають парентеральне введення, таке як внутрішньом'язове, внутрішньовенне або підшкірне введення. Введення антитіла, використововуваного у фармацевтичній композиції або для практичного здійснення способу за даним винаходом, можна здійснювати різними стандартними шляхами, такими як пероральний прийом усередину, інгаляція, місцеве нанесення або шкірна, підшкірна, інтраперитонеальна, парентеральна, внутрішньоартеріальна або внутрішньовенна ін'єкція. В одному з варіантів здійснення з'єднувальну сполуку за винаходом вводять внутрішньовенно. В іншому варіанті здійснення з'єднувальну сполуку за винаходом вводять підшкірно.

Попеременно можна вводити антитіло місцево замість системного введення, наприклад, шляхом ін'єкції антитіла безпосередньо в суглоб, вражений артритом, або викликане патогеном ушкодження, що характеризується імунопатологією, часто в депо-складі або складі з уповільненим вивільненням. Крім того, можна вводити антитіло в направлений системі доставки лікарського засобу, наприклад, у ліпосомі, покритій тканинспецифічним антитілом, націленим, наприклад, на суглоб, уражений артритом, або викликане патогеном ушкодження, що характеризується імунопатологією. Ліпосоми будуть націлені на уражену тканину і будуть вибірково захоплюватися нею.

Вибір режиму введення терапевтичного засобу залежить від декількох факторів, включаючи швидкість обороту об'єкта в сироватці або тканині, рівень симптомів, імуногенність об'єкта і доступність клітин-мішеней у біологічному середовищі. Переважно, режим введення максимізує кількість терапевтичного засобу, що доставляється пацієнту, відповідно до прийнятного рівня побічних ефектів. Відповідно, доставлена кількість біологічного засобу частково залежить від

конкретного об'єкта і тяжкості стану, що підлягає лікуванню. Доступний посібник з вибору придатних доз антитіл, цитокінів і низькомолекулярних сполук (див., наприклад, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Disorders*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert, et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom, et al. (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon, et al. (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz, et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh, et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky, et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602).

Визначення придатної дози здійснює клініцист, наприклад, використовуючи параметри або фактори, відомі або передбачувані в даній галузі для впливу на лікування або передбачувані для впливу на лікування. У цілому, доза починається з кількості, що трохи нижче, ніж оптимальна доза, і згодом її підвищують невеликими кроками, поки не буде досягнутий бажаний або оптимальний ефект стосовно яких-небудь негативних побічних ефектів. Важливі діагностичні критерії включають такі симптоми, наприклад, запалення, або рівень продукованих запальних цитокінів. Переважно, біологічний засіб, який варто використовувати, одержують від тих же видів, що і тварину, яку планують лікувати, тим самим мінімізуючи запальну, аутоімунну або проліферативну відповідь на реактив.

Антитіла, фрагменти антитіл і цитокіни можна надавати за допомогою безупинної інфузії або за допомогою доз з інтервалами, наприклад, одна доба, один тиждень або 1-7 разів на тиждень. Дози можна надавати внутрішньовенно, підшкірно, місцево, перорально, назально, ректально, внутрішньом'язово, інтрацеребрально, інтраспінально або за допомогою інгаляції. Переважним протоколом дозування є той, в якому використовують максимальну дозу або частоту доз, що уникає значимих небажаних побічних ефектів. Загальна тижнева доза, як правило, складає щонайменше 0,05 мкг/кг маси тіла, більш звичайно щонайменше 0,2 мкг/кг, найбільш звичайно щонайменше 0,5 мкг/кг, типово щонайменше 1 мкг/кг, більш типово щонайменше 10 мкг/кг, найбільш типово щонайменше 100 мкг/кг, переважно щонайменше 0,2 мг/кг, більш переважно щонайменше 1,0 мг/кг, найбільш переважно щонайменше 2,0 мг/кг, оптимально щонайменше 10 мг/кг, більш оптимально щонайменше 25 мг/кг і найбільш оптимально щонайменше 50 мг/кг (див., наприклад, Yang, et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Herold, et al. (2002) *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liu, et al. (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portielji, et al. (20003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:133-144). Бажана доза низькомолекулярного терапевтичного засобу, наприклад, пептидоміметика, природного продукту або органічної хімічної речовини складає приблизно стільки ж, скільки для антитіла або поліпептиду, у перерахуванні на моль/кг.

Як застосовують у даному документі, "інгібувати" або "лікувати" або "лікування" включає відстрочення розвитку симптомів, асоційованих з аутоімунним захворюванням або індукованою патогеном імунопатологією, і/або зниження тяжкості таких симптомів, що будуть або приблизно будуть розвиватися. Крім того, терміни включають поліпшення існуючих неконтрольованих або небажаних аутоімунних або індукованих патогеном симптомів імунопатології, запобігання додаткових симптомів і поліпшення або запобігання першопричин таких симптомів. Таким чином, терміни вказують на те, що хребетний суб'єкт із запальним захворюванням одержав корисний результат.

Як застосовують у даному документі, термін "терапевтично ефективна кількість" або "ефективна кількість" стосується кількості антитіла проти TSLP або його фрагмента, що при введенні окремо або в поєднанні з додатковим терапевтичним засобом у клітину, тканину або суб'єкту ефективно запобігає або поліпшує аутоімунне захворювання або захворювання або стан, асоційований з індукованою патогеном імунопатологією, або розвиток захворювання. Терапевтично ефективна доза додатково стосується тієї кількості сполуки, що достатня для того, щоб привести до поліпшення симптомів, наприклад, лікуванню, вилікуванню, запобіганню, або поліпшенню відповідного медичного стану або збільшенню швидкості лікування, вилікування, запобігання або поліпшення таких станів. Коли застосовують до окремого активного інгредієнта, що вводиться окремо, терапевтично ефективна доза стосується окремо цього інгредієнта. Коли застосовують до комбінації, терапевтично ефективна доза стосується комбінованих кількостей активних інгредієнтів, що приводять до терапевтичного ефекту, чи вводять їхній у комбінації, послідовно або одночасно. Ефективна кількість терапевтичного засобу повинна знижувати симптоми типово щонайменше на 10 %; звичайно щонайменше на 20 %; переважно щонайменше приблизно на 30 %; більш переважно щонайменше на 40 % і найбільш переважно щонайменше на 50 %.

Способи спільного введення або лікування антитілом проти TSLP або його антигензв'язувальним фрагментом за даним винаходом і другим терапевтичним засобом, наприклад, цитокином, стероїдом, хіміотерапевтичним засобом, антибіотиком або випромінюванням (або будь-яким таким засобом, розглянутим в даному документі) утворюють частину даного винаходу, у цілому див., наприклад, Hardman, et al. (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, NY; Poole and Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner and Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy і Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA. Антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти і їх фармацевтичні композиції за винаходом також можуть містити інші імуносупресорні або імуномодулюючі засоби. Можна використовувати будь-який придатний імуносупресорний засіб, включаючи як необмежуючі приклади протизапальні засоби, кортикостероїди, циклоспорин, такролімус (тобто, FK-506), сиролімус, інтерферони, розчинні рецептори цитокинів (наприклад, sTNRF і sIL-1R), засоби, що нейтралізують активність цитокинів (наприклад, інфліксмаб, адалімумаб, голімумаб, етанерцепт), мікофенолат мофетил, 15-дезоксиспергуалін, талідомід, глатирамер, азатіоприн, лефлуномід, циклофосфамід, метотрексат і т. п. Нестероїдні протизапальні лікарські засоби також можна надавати з антитілом або його антигензв'язувальним фрагментом або його фармацевтичною композицією за даним винаходом. Фармацевтичну композицію також можна використовувати з іншими терапевтичними модальностями, такими як фототерапія і випромінювання. Об'єм даного винаходу включає композиції, що містять будь-яке антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за даним винаходом і будь-який другий терапевтичний засіб (наприклад, як розглянуто в даному документі, наприклад, де антитіло або фрагмент формулюють роздільно з другим терапевтичним засобом або де їх формулюють разом).

Типові ветеринарні, експериментальні або досліджувані суб'єкти включають мавп, собак, кішок, щурів, мишей, кроликів, морських свинок, коней і людину.

VII. Отримання антитіл

Для рекомбінантного отримання антитіл за даним винаходом нуклеїнові кислоти, що кодують два ланцюги, виділяють і вбудовують в один або декілька реплікованих векторів для подальшого клонування (ампліфікація ДНК) або для експресії. ДНК, що кодує моноклональне антитіло, легко виділяють і секвенують із застосуванням стандартних процедур (наприклад, за допомогою застосування олігонуклеотидних зондів, які здатні зв'язуватися специфічно з генами, що кодують важкі і легкі ланцюги антитіл). Доступна множина векторів. Компоненти векторів, як правило, включають як необмежувальні приклади, одне або декілька з наступного: сигнальна послідовність, ділянка початку реплікації, один або декілька маркерних генів, енхансерний елемент, промотор і послідовність термінації транскрипції. В одному з варіантів здійснення як легкий, так і важкий ланцюги гуманізованого антитіла проти TSLP за даним винаходом експресують з одного і того ж вектора, наприклад, з плазміди або аденовірусного вектора.

Антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти за даним винаходом можна отримувати будь-яким відомим в даній галузі способом. В одному з варіантів здійснення антитіла експресують в клітинах ссавців або комах в культурі, таких як клітини яєчника китайського хом'яка (CHO), клітини ембріональної нирки людини (HEK) 293, клітини мієломи миші NSO, клітини нирки дитинча хом'яка (BHK), клітини яєчника *Spodoptera frugiperda* (Sf9). В одному з варіантів здійснення винаходу антитіла і їх антигензв'язувальні фрагменти отримують в клітинах грибів, таких як клітини *Pichia*, клітини *Pichia pastoris*, клітини *Pichia finlandica*, клітини *Pichia trehalophila*, клітини *Pichia koclamae*, клітини *Pichia membranaefaciens*, клітини *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), клітини *Pichia opuntiae*, клітини *Pichia thermotolerans*, клітини *Pichia salictaria*, клітини *Pichia guercuum*, клітини *Pichia pijperi*, клітини *Pichia stiptis*, клітини *Pichia methanolica*, клітини *Saccharomyces cerevisiae*, клітини *Saccharomyces*, клітини *Hansβnula polymorpha*, клітини *Kluuyveromyces*, клітини *Kluuyveromyces lactis*, клітини *Candida albicans*, клітини *Aspergillus nidulans*, клітини *Aspergillus niger*, клітини *Aspergillus oryzae*, клітини *Trichoderma reesei*, клітини *Chrysosporium lucknowense*, клітини *Fusarium gramineum*, клітини *Fusarium gramineum*, клітини *Fusarium venenatum* або клітин *Neurasporea crassa*.

В одному з варіантів здійснення антитіла, секретовані клітинами CHO, витягують і очищають стандартними хроматографічними способами, такими як хроматографія з білком А, катіонообмінна хроматографія, аніонообмінна хроматографія, хроматографія гідрофобної взаємодії і гідроксіапатитна хроматографія. Антитіла, що отримуються, концентрують і зберігають в 20 мМ ацетаті натрію, рН 5,5.

В іншому варіанті здійснення антитіла за даним винаходом отримують в дріжджах відповідно до способів, описаних в WO 2005/040395. У короткому викладі, вектори, що кодують

окремі легкі або важкі ланцюги антитіла, що представляє інтерес, вводять в різні гаплоїдні клітини дріжджів, наприклад, в дріжджі *Pichia pastoris* з різними типами спаровування, ці гаплоїдні клітини дріжджів необов'язково являють собою комплементарні ауксотрофи. Потім трансформовані гаплоїдні клітини дріжджів можна парувати або зливати для того, щоб

5 отримати диплоїдну клітину дріжджів, здатну продукувати як важкі, так і легкі ланцюги. Тоді диплоїдний штам здатний секретувати повністю зібране і біологічно активне антитіло. Відносні рівні експресії двох ланцюгів можна оптимізувати, наприклад, використовуючи вектори з різним числом піків, використовуючи транскрипційні промотори з різною інтенсивністю або індуючи експресію з індукцйбельних промоторів, керуючих транскрипцією генів, що кодують один або

10 обидва ланцюги.

В одному з варіантів здійснення відповідні важкі і легкі ланцюги антитіла проти TSLP вводять в гаплоїдні клітини дріжджів для того, щоб створити бібліотеку гаплоїдних штамів дріжджів з одним типом спаровування, які експресують множину легких ланцюгів, і бібліотеку гаплоїдних штамів дріжджів з іншим типом спаровування, які експресують множину важких ланцюгів. Ці бібліотеки гаплоїдних штамів можна схрещувати (або зливати у вигляді сферопластів), щоб отримати ряд диплоїдних клітин дріжджів, експресуючих комбінаторну бібліотеку антитіл, що складаються з різних можливих комбінацій легких і важких ланцюгів. Потім можна здійснювати скринінг комбінаторної бібліотеки антитіл для того, щоб визначити, чи має будь-яке з антитіл властивості, які перевершують (наприклад, вища афінність до TSLP) такі

15 вихідних антитіл. Див., наприклад, WO 2005/040395.

В іншому варіанті здійснення антитіла за даним винаходом являють собою доменні антитіла людини, в яких частини варіабельного домену антитіла з'єднані в поліпептид з молекулярною масою приблизно 13 кДа. Див., наприклад, публікацію патенту США № 2004/0110941. Такі однодоменні низькомолекулярні засоби забезпечують безліч переваг відносно простоти

20 синтезу, стабільності і шляхів введення.

VIII. Застосування

Даний винахід стосується способів застосування сконструйованих засобів проти TSLP для лікування і діагностики запальних порушень (наприклад, у ссавців, таких як людина).

У переважному варіанті здійснення запальне порушення являє собою астму.

В іншому переважному варіанті здійснення запальне порушення являє собою алергічне запальне порушення. У переважному варіанті здійснення алергічне запальне порушення являє собою алергічний риносинусит, алергічну астму, алергічний кон'юнктивіт або atopічний дерматит.

Даний винахід стосується способів застосування сконструйованого засобу проти TSLP для лікування і діагностики фіброзу, запального захворювання кишечника, лімфоми Ходжкіна, респіраторної вірусної інфекції або інших вірусних інфекцій, ревматоїдного артриту або будь-якого іншого порушення, що характеризується запаленням в місці запалення.

Межі об'єму даного винаходу краще усього зрозуміти за допомогою посилання на наступні приклади, які не призначені для обмеження винаходу конкретними варіантами здійснення.

Всі посилання в цьому документі включені в цей документ за допомогою посилання в тій же мірі, як якщо конкретно і окремо указали, що кожна окрема публікація або патентна заявка включена за допомогою посилання.

Багато які модифікації і варіації даного винаходу можна виконувати, не відступаючи від суті і об'єму, як буде ясно фахівцям в даній галузі. Конкретні варіанти здійснення, описані в цьому документі, запропоновані тільки як приклад, а винахід обмежений положеннями прикладеної формули винаходу, нарівні з повним об'ємом еквівалентів, на які дає право така формула винаходу; і винахід не повинний бути обмежений конкретними варіантами здійснення, які представлені в цьому документі як приклади.

Приклад 1

Основні способи

Описані стандартні способи в молекулярній біології (Maniatis et al. (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). Стандартні способи також присутні в Ausbel et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols.1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, де описані клонування в бактерійних клітинах і мутагенез ДНК (Vol. 1), клонування в клітинах ссавців і дріжджів (Vol. 2), глікокон'югати і експресія білків (Vol. 3) і біоінформатика (Vol. 4).

Описані способи очищення білків, включаючи імунопреципітацію, хроматографію, електрофорез, центрифугування і кристалізацію, (Coligan et al. (2000) *Current Protocols in Protein*

Science, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York). Описаний хімічний аналіз, хімічні модифікації, посттрансляційні модифікації, отримання злитих білків, глікозилювання білків (див., наприклад, Coligan et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16,0,5-16,22,17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp. 384-391). Описане отримання, очищення і фрагментація поліклональних і моноклональних антитіл (Coligan et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow and Lane, вище). Доступні стандартні способи визначення характеристик взаємодій ліганд/рецептор (див., наприклад, Coligan et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York).

Описані одноланцюжкові антитіла і діатіла (див., наприклад, Malecki et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:213-218; Conrath et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:7346-7350; Desmyter et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:26285-26290; Hudson and Kortt (1999) *J. Immunol. Methods* 231:177-189; і патент США № 4946778). Передбачені біфункціональні антитіла (див., наприклад, Mack, et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7021-7025; Carter (2001) *J. Immunol. Methods* 248:7-15; Volkel, et al. (2001) *Protein Engineering* 14:815-823; Segal, et al. (2001) *J. Immunol. Methods* 248:1-6; Brennan, et al. (1985) *Science* 229:81-83; Raso, et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:27623; Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; Traunecker, et al. (1991) *EMBO J.* 10:3655-3659; і патенти США №№ 5932448, 5532210 і 6129914).

Також передбачені біспецифічні антитіла (див., наприклад, Azzoni et al. (1998) *J. Immunol.* 161:3493; Kita et al. (1999) *J. Immunol.* 162:6901; Merchant et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275:9115; Pandey et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275:38633; Zheng et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:12999; Propst et al. (2000) *J. Immunol.* 165:2214; Long (1999) *Ann. Rev. Immunol.* 17:875).

Можна створювати кон'югати антитіл, наприклад, з малими лікарськими молекулами, ферментами, ліпосомами, поліетиленгліколем (PEG). Антитіла можна використовувати для терапевтичних, діагностичних цілей, наборів або інших цілей і вони включають антитіла, сполучені, наприклад, з барвниками, радіоізотопами, ферментами або металами, наприклад, колоїдним золотом (див., наприклад, Le Doussal et al. (1991) *J. Immunol.* 146:169-175; Gibellini et al. (1998) *J. Immunol.* 160:3891-3898; Hsing і Bishop (1999) *J. Immunol.* 162:2804-2811; Everts et al. (2002) *J. Immunol.* 168:883-889).

Доступні способи проточної цитометрії, включаючи сортування флуоресцентно-активованих клітин (FACS) (див., наприклад, Owens et al. (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2nd ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ). Доступні флуоресцентні реактиви, придатні для модифікації нуклеїнових кислот, включаючи праймери і зонди з нуклеїнових кислот, поліпептиди і антитіла, для застосування, наприклад, як діагностичні реактиви (*Molecular Probes* (2003) *Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) *Catalogue*, St. Louis, MO).

Описані стандартні способи гістології імунної системи (див., наприклад, Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, New York, NY; Hiatt, et al. (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, PA; Louis, et al. (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, New York, NY).

Доступні програмні пакети і бази даних для визначення, наприклад, антигенних фрагментів, лідерних послідовностей, укладання білка, функціональних доменів, ділянок глікозилювання і вирівнювання послідовностей (див., наприклад, GenBank, Vector NTJ® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne et al. (2000) *Bioinformatics* 16: 741-742; Menne et al. (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16:741-742; Wren et al. (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181; von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690).

Приклад 2

Оптимізація послідовності антитіла проти TSLP, щоб уникнути проблем дезамідування

Гуманізоване антитіло, яке зв'язується з TSLP людини і яванської макаки, розкрито в міжнародній публікації патенту WO 2008/076321. Після додаткового аналізу цієї послідовності, автор даного винаходу встановив, що CDR-H2 цього антитіла містить два залишки аспарагіну (N) в положеннях 61 і 63 в SEQ ID NO: 4 з WO 2008/076321, які ймовірно можуть дезамідуватися і тим самим порушити структуру антитіла, ймовірно викликаючи важкі непередбачені проблеми, що впливають на безпеку і/або ефективність антитіла. Щоб уникнути цих проблем автори

даного винаходу створили вдосконалене антитіло, яке уникає цих проблем дезамідування, при цьому зберігши афінність до TSLP людини і яванської макаки і уникаючи додаткових проблем, що відносяться до імуногенності. Це вдосконалене антитіло містить амінокислотну послідовність варіабельного важкого ланцюга SEQ ID NO: 7. CDR-H2 цих амінокислотних послідовностей відповідає SEQ ID NO: 2.

На Фіг. 1 надано вирівнювання SEQ ID NO: 11 з даної заявки проти SEQ ID NO: 14 з WO 2008/076321 (тобто, вирівнювання важких ланцюгів антитіла, заявленого в цьому документі, і антитіла, розкритого в WO 2008/076321. На Фіг. 1, "Послідовність 1" відповідає SEQ ID NO: 11 з даної заявки і "Послідовність 2" відповідає SEQ ID NO: 14 з WO 2008/076321. В антитілі, заявленому в цьому документі, аспарагін (N) в положенні 61 SEQ ID NO: 14 з WO 2008/076321 змінювали на аланін (A) і аспарагін в положенні 63 SEQ ID NO: 14 змінювали на лізин (K). Ці зміни виконували для того, щоб уникнути можливого дезамідування цих залишків. Додатково, лізин (K) в положенні 65 SEQ ID NO: 4 з WO 2008/076321 змінювали на глутамін (Q). Цю зміну виконували для того, щоб знизити шанс створення імуногенності. Додаткову зміну виконували в положенні 72 SEQ ID NO: 14 з WO 2008/076321, де треонін (T) змінювали на аланін (A). Цю зміну виконували для того, щоб поліпшити афінність зв'язування антитіла.

На подив, виявлено, що зміни в CDR-H2 по суті не впливають на афінність зв'язування антитіла, що отримується.

Вектор, що містить гени, які кодують важкий і легкий ланцюг антитіла, описані в цьому документі, депонованому в ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, 17 листопада 2009 року і маючому номер депозиту ATCC PTA-10482. Цей депозит створений згідно з умовами, передбаченими Будапештською угодою. Послідовності нуклеїнової кислоти, що кодують легкий і важкий ланцюги (включаючи сигнальні пептиди), знаходяться в одній плазміді і обидва гени експресують з промотору цитомегаловірусу людини (CMV). Плазміда також містить ген стійкості до ампіциліну для відбору в клітинах ссавців і генів DHFR для ампліфікації гена.

Приклад 3

Визначення рівноважної константи дисоціації (K_D) для гуманізованого засобу проти TSLP людини із застосуванням технології KinExA

Рівноважну константу дисоціації (K_D) визначали з використанням приладу KinExA 3000 (Sapidyne Instruments Inc., www.sapidyne.com). У KinExA використаний принцип способу кінетичного ексклюзійного аналізу на основі вимірювання концентрації антитіла, не створюючого комплекс, в суміші антитіла, антигену і комплексу антитіло-антиген. Концентрацію вільного антитіла вимірюють за допомогою впливу на суміш антигеном, імобілізованим на твердій фазі, протягом дуже короткого періоду часу. На практиці це здійснюють за допомогою протікання розчиненої фази суміші антиген-антитіло через покриті антигеном частинки, взяті в проточну кювету. Дані, що генеруються приладом, аналізували за допомогою спеціального програмного забезпечення. Константи рівноваги обчислювали з використанням математичної теорії, основуючись на наступних допущеннях:

1. Зв'язування підкоряється рівнянню оборотного зв'язування для рівноваги:

$$k_{on} [Ab] [Ag] = k_{off} [AbAg]$$

2. Антитіло і антиген зв'язуються 1:1 і загальне антитіло дорівнює сумі комплексу антиген-антитіло і вільного антитіла.

3. Сигнал приладу лінійно залежить від концентрації вільного антитіла.

Речовини

Антитіла:

- Антитіло 1: Батьківське антитіло щура 23B12

- Антитіло 2: Гуманізоване mAb 23B12 проти hu TSLP (містить важкий ланцюг SEQ ID NO: 14 і легкий ланцюг SEQ ID NO: 16 з WO 2008/076321)

- Антитіло 3: Гуманізоване mAb 23B12 проти hu TSLP (містить важкий ланцюг SEQ ID NO: 14 з мутацією в положенні 72 з T на A і легкий ланцюг SEQ ID NO: 16 з WO 2008/076321)

- Антитіло 4: Гуманізоване mAb 23B12 проти hu TSLP (містить важкий ланцюг SEQ ID NO: 11 і легкий ланцюг SEQ ID NO: 12 з даної заявки)

Антигени:

- Рекombінантний TSLP людини

Біотинізовані антигени:

- Біотинілований TSLP людини

Інші реактиви:

- Частинки PMMA, 98 мкм (Sapidyne, № по каталогу 440198)

- Нейтравідин (Pierce, № по каталогу 31000)

- Су5-кон'юговане антитіло кози проти IgG щура (H+L) (Jackson Immunoresearch Laboratories № по каталогу 112-175-167, партія 60306)

- Су5-кон'юговане антитіло кози проти HulgG (H+L) (Jackson Immunoresearch Laboratories № по каталогу 109-175-088, партія 49069 і партія 58552)

5 Умови експерименту:

Частинки PMMA покривали біотинілованим TSLP людини згідно з "Protocol for coating PMMA particles with biotinylated ligands having short or nonexistent linker arms" Sapidyne. Всі експериментальні процедури виконували відповідно до керівництва до KinExA 3000. Всі експерименти виконували двічі.

10 Використовували наступні умови:

Об'єм зразка: 2 мл

Швидкість потоку зразка: 0,25 мл/хв.

Об'єм мітки: 1 мл

Швидкість потоку мітки: 0,25 мл/хв.

15 Концентрація антитіла: 0,1 нМ

Найвища концентрація антигену: 10 нМ

Найбільш низька концентрація антигену: 10 пМ

Отримували двократне серійне розведення антигену і змішували їх з антитілом при постійній концентрації. Суміш інкубували протягом 2 годин при 25 °C для досягнення рівноваги.

20

Таблиця 3

Значення KD, які визначили з допомогою KinExa

mAb	TSLP	Експресія	KD (нМ)
Антитіло 1	людина	HEK293	1,1
Антитіло 2	людина	HEK293	7,7
Антитіло 3	людина	HEK293	1,6
Антитіло 4	людина	HEK293	3,2

Приклад 4

Афінність антитіл до TSLP людини і яванської макаки

25 Активність кінетичного зв'язування батьківського антитіла щура і різних гуманізованих похідних антитіл до TSLP людини проти TSLP як людини (hu), так і яванської макаки (супо), вимірювали за допомогою поверхневого плазмонного резонансу з використанням системи BIAcore T100 (BIAcore AB, Uppsala, Sweden). Приблизно 100 RU TSLP людини або TSLP яванської макаки імобілізували за допомогою реакції зв'язування амінів на сенсорному чіпі CM5 (марки для досліджень, BR-1006-68). Буфер HBS-EP (BR-1006-69) використали як рухомий

30 буфер з швидкістю потоку 30 мкл/хв. Щурячі і гуманізовані 23B12 антитіла при різних концентраціях в діапазоні від 0,82 до 600 нМ ін'єктували на поверхні з імобілізованими TSLP hu або яванської макаки з швидкістю потоку 30 мкл/хв. Після кожного циклу ін'єкцій поверхню чіпа CM5 відновлювали із застосуванням ряду розчинів (10 мМ гліцин рН 1,5 і 25 мМ NaOH відповідно) при швидкості потоку 75 мкл/хв.

35 Сенсограми зв'язування з відніманням фону використали для аналізу константи швидкості асоціації (ka) і дисоціації (kd) і рівноважної константи дисоціації KD. Набори даних, що отримуються, узгоджувалися з моделлю бівалентної речовини, що аналізується з використанням програмного забезпечення BIAevaluation (версії 1.0). KD, які визначали для різних антитіл, наведені в таблиці 4. Результати окремих експериментів наведені в окремих

40 рядках

Таблиця 4

Аналіз BIAcore

TSLP	K _D (nM)			
	Антитіло 1	Антитіло 2	Антитіло 3	Антитіло 4
Людина	141	Не визначено	Не визначено	172
Людина	130	150	128	Не визначено
Людина	Не визначено	Не визначено	Не визначено	155, 142, 339, 170, 153
Людина *	Не визначено	Не визначено	Не визначено	339
Людина *, **	Не визначено	Не визначено	Не визначено	299
Цино	159	Не визначено	Не визначено	138, 80, 115
Цино	Не визначено	Не визначено	Не визначено	127
Цино**	Не визначено	Не визначено	Не визначено	381

* В цьому конкретному експерименті використали TSLP, придбаний в R&D і експресований в E. coli. Інші експерименти проводили з TSLP, експресованим в клітинах HEK293.

** Ці експерименти проводили при 37 °C. Всі інші експерименти проводили при кімнатній температурі.

Антитіло 1: Батьківське антитіло щура 23B12

Антитіло 2: Гуманізоване mAb 23B12 проти hu TSLP (містить важкий ланцюг SEQ ID NO: 14 і легкий ланцюг SEQ ID NO: 16 з WO 2008/076321)

Антитіло 3: Гуманізоване mAb 23B12 проти hu TSLP (містить важкий ланцюг SEQ ID NO: 14 з мутацією в положенні 72 з T на A; і легкий ланцюг SEQ ID NO: 16 з WO 2008/076321)

Антитіло 4: Гуманізоване mAb 23B12 проти hu TSLP (містить важкий ланцюг SEQ ID NO: 11 і легкий ланцюг SEQ ID NO: 12 з даної заявки)

Приклад 5

Біологічний аналіз проліферації для оцінки нейтралізуючого антитіла проти TSLP

- 5 Здатність різних антитіл проти TSLP до біологічної нейтралізації TSLP людини і яванської макаки оцінювали за допомогою застосування біологічних аналізів короточасної проліферації, в яких використовують клітини, які експресують рекомбінантні рецептори TSLP людини і яванської макаки. Клітини трансфектанту Ba/F3-TSLPR-IL7Ra проліферують у відповідь на TSLP і відповідь можна інгібувати за допомогою нейтралізуючих антитіл проти TSLP. Кожне
- 10 антитіло титрували проти концентрації TSLP, вибраної всередині лінійної області кривої доза TSLP-відповідь, близько з плато і вище TSLP EC₅₀. Проліферацію або її відсутність вимірюють за допомогою колориметричного засобу із застосуванням Alamar Blue, барвника-індикатора росту, основуючись на виявленні метаболічної активності. Здатність антитіла нейтралізувати TSLP оцінювали з допомогою його значення EC₅₀ або концентрації антитіла, яка викликає
- 15 напівмаксимальне інгібування TSLP проліферації.

Трансфектанти Ba/F3 підтримували в середовищі RPMI-1640, 10 % фетальна теляча сироватка, 50 мкМ 2-меркаптоетанол, 2 мМ L-глутамін, 50 мкг/мл пеніцилін-стрептоміцин і 10 нг/мл IL-3 миші.

- 20 Біологічні аналізи проліферації Ba/F3 здійснювали в середовищі RPMI-1640, 10 % фетальна теляча сироватка, 50 мкМ 2-меркаптоетанол, 2 мМ L-глутамін і 50 мкг/мл пеніцилін-стрептоміцин.

- 25 Аналіз здійснювали в 96-ямкових плоскодонних планшетах (Falcon 3072 або подібний). У всіх препаратах реактивів і клітинних суспензій використали відповідне середовище для біологічного аналізу. Об'єм аналізу становить 150 мкл на ямку. Титрації антитіла проти TSLP заздалегідь інкубували з TSLP протягом 30-60 хвилин при кімнатній температурі, а в цей час отримували клітини. Клітини додавали в планшети після попереднього інкубування антитіла-цитокіну. Планшети з біологічним аналізом інкубували в зволоженій камері для тканинної культури (37 °C, 5 % CO₂) протягом 40-48 годин. У кінці часу культивування, Alamar Blue (Biosource № по каталогу DAL1100) додавали і дозволяли розвиватися протягом 8-12 годин.
- 30 Потім зчитували поглинання при 570 нм і 600 нм (зчитувач мікропланшетів VERSAmax, Molecular Probes) і отримували OD₅₇₀₋₆₀₀. Рекомендоване повторення два або три рази.

Клітини використали в стані здорового росту, як правило, при густині 3-8×10⁵/мл. Клітини підраховували, осаджували, двічі промивали в середовищі для біологічного аналізу і суспендували до густини, відповідної для посіву.

Отримували TSLP з робочою концентрацією і додавали 75 мкл в першу ямку. Серійне розведення 1:3 виконували за допомогою титрування 25:50 мкл в середовищі для біологічного аналізу по всіх ямках, залишаючи 50 мкл/ямка. Клітини суспендували до відповідної густини для посіву по 100 мкл на ямку.

Отримували антитіло в робочою концентрацією і 75 мкл додавали в першу ямку. Серійне розведення 1:3 виконували за допомогою титрування 25:50 мкл в середовищі для біологічного аналізу по всіх ямках, залишаючи 50 мкл на ямку. TSLP з відповідною концентрацією додавали по 50 мкл на ямку в ямки, що містять титроване антитіло. Клітини суспендували до відповідної густини для посіву по 50 мкл на ямку і додавали після попереднього інкубування антитіла-цитокіну.

Використовуючи програмне забезпечення GraphPad Prism 3.0, будували графік залежності поглинання від концентрації цитокіну або антитіла і визначали значення EC_{50} , використовуючи нелінійну регресію (підбір кривої) сигмовидної дози-відповіді.

Результати аналізу наведені в таблиці 5. Результати окремих експериментів наведені в окремих рядках.

Таблиця 5

Інгібування проліферації

TSLP	EC_{50} (мкг/мл)			
	Антитіло 1	Антитіло 2	Антитіло 3	Антитіло 4
Людина	0,022	Не визначено	Не визначено	0,041
Людина	0,025	0,092	0,054	Не визначено
Людина	0,014	Не визначено	Не визначено	0,024
Людина*	0,083	Не визначено	Не визначено	0,215, 0,137
Цино	0,064	Не визначено	Не визначено	0,117, 0,077
Цино	0,122	Не визначено	Не визначено	0,158
Цино**	0,054	Не визначено	Не визначено	0,067

* В цьому конкретному експерименті використали TSLP, придбаний в R&D і експресований в E. coli. Інші експерименти проводили з TSLP, експресованим в клітинах HEK293.

Антитіло 1: Батьківське антитіло щура 23B12

Антитіло 2: Гуманізоване mAb 23B12 проти hu TSLP (містить важкий ланцюг SEQ ID NO: 14 і легкий ланцюг SEQ ID NO: 16 з WO 2008/076321)

Антитіло 3: Гуманізоване mAb 23B12 проти hu TSLP (містить важкий ланцюг SEQ ID NO: 14 з мутацією в положенні 72 з Т на А; і легкий ланцюг SEQ ID NO: 16 з WO 2008/076321)

Антитіло 4: Гуманізоване mAb 23B12 проти hu TSLP (містить важкий ланцюг SEQ ID NO: 11 і легкий ланцюг SEQ ID NO: 12 з даної заявки)

Зведення результатів, представлених в таблиці 5, що включає середні значення і SD (стандартне відхилення), наведене в таблиці 6. (Тільки значення, отримані із застосуванням TSLP, експресованого в клітинах HEK293, використали для обчислення значень, представлених в таблиці 6)

Таблиця 6

	Біологічний аналіз (пМ)	
	Трансфектант Ba/F3	
	HTSLP (SD)	cTSLP (SD)
Антитіло 1	120 (37)	528 (242)
Антитіло 4	214 (80)	691 (274)

Приклад 6

Нейтралізуюча активність засобу проти TSLP, що виявляється на індукованій TSLP продукції TARC первинними дендритними клітинами людини

Мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) виділяли з лейкоцитарної плівки, отриманої від здорових донорів крові (Stanford Medical School Blood Center, Stanford, CA) за допомогою центрифугування з фіколом, і CD11c+ дендритні клітини отримували за допомогою MACS (Miltenyi Biotech, Auburn, CA), використовуючи негативний відбір з подальшим сортуванням клітин із застосуванням FACS. Клітини негативної лінії диференціювання (Lin-) отримували за допомогою MACS-елімінації Т-клітин, В клітин, NK клітин, червоних клітин крові і моноцитів з PBMC із застосуванням mAb миші проти CD3 людини (ОКТ3, DNAX) і mAb миші

проти CD16 і магнітних бус, покритих антитілами кози проти IgG миші (Miltenyi Biotech), і із застосуванням магнітних бус, безпосередньо покритих mAb проти CD19, CD56 і CD14 (Miltenyi Biotech). Згодом Lin- клітини забарвлювали із застосуванням TC проти CD4 (Caltag, Burlingame, CA), PE проти C11c і FITC проти CD3, CD14, CD19, CD56, CD16 і CD20 (всі з BD Biosciences, San Diego, CA) і CD11c+DC сортували на Vantage FACsorter™ (BD Biosciences) до чистоти > 99 % CD11c+CD4+Lin- клітин.

CD11c+CD4+DC культивували безпосередньо після сортування в RPMI (Mediatech, Herndon, VA), що містить 10 % FCS і 1 % пірувату (Mediatech), HEPES (Invitrogen, Grand Island, NY) і пеніцилін-стрептоміцин (Mediatech). Клітини висівали при $0,5 \times 10^6$ /мл в плоскодонні 96-ямкові планшети в присутності тільки середовища, TSLP (15 нг/мл, DNAX), або комбінації TSLP і нейтралізуючий mAb проти TSLP (клон 23B12) або моноклонального антитіла проти TSLPR або IgG2a щура для ізотипічного контролю (R&D Systems, Minneapolis, MN). Супернатанти культури DC збирали після 24 годин культивування, зберігали замороженими при -20 °C і аналізували рівні білка TARC за допомогою ELISA (R&D Systems).

Результати підсумовувані в таблиці 7. Результати окремих експериментів наведені в окремих рядках.

Таблиця 7

TSLP	EC ₅₀ (мкг/мл)	
	Антитіло 1	Антитіло 4
Людина	0,12	0,16
Людина	0,0069	0,0077
Людина	0,031	0,060
Людина (R&D)*	0,050	0,102, 0,126
Людина (R&D)*	0,113	0,067, 0,173
Людина (R&D)*	0,228	0,424
Людина (R&D)*	0,404	0,164

* В цих експериментах використали TSLP, придбані в R&D і експресовані в E. coli. Інші експерименти проводили із застосуванням TSLP, експресованого в клітинах HEK293.

Антитіло 1: Батьківське антитіло 23B12 щура

Антитіло 4: Гуманізоване mAb 23B12 проти hu TSLP (містить важкий ланцюг SEQ ID NO: 11 і легкий ланцюг SEQ ID NO: 12 з даної заявки)

Зведення результатів, представлених в таблиці 7, включаючи середні значення і SD (стандартне відхилення), надане в таблиці 8.

Таблиця 8

	Біологічний аналіз (пМ)	
	Продукція TARC в DC людини	
	hTSLP (SD)	hTSLP* (SD)
Антитіло 1	345 (389)	1312 (1025)
Антитіло 4	492 (502)	1161 (843)

* В цих експериментах використали TSLP, придбаний в R&D і експресований в E. coli. Інші експерименти проводили із застосуванням TSLP, експресованого в клітинах HEK293.

Приклад 7

Нейтралізуюча активність антитіл проти TSLP, що виявляється на індукованій TSLP продукції MDC спленоцитами яванської макаки

Повні суспензії спленоцитів отримували з селезінки яванської макаки за допомогою руйнування тканини і пропущення її через сито 50 меш з тканини з нержавіючої сталі (Bellco) з подальшим пропущенням через 70 мкм нейлонове сито для клітин (BD Falcon). Клітинні суспензії промивали в DPBS за допомогою центрифугування і клітинні осадки ресуспендували в попередньо нагрітому до 37 °C лізуючому буфері ACK (BioWhittaker) для того, щоб лізувати червоні клітини крові, і інкубували протягом 5 хвилин при 37 °C. Клітини розбавляли із застосуванням DPBS, двічі промивали і ресуспендували в культуральному середовищі.

Спленоцити культивували в RPMI (Mediatech, Herndon, VA), що містить 10 % FCS і 1 % пірувату (Mediatech), HEPES (Invitrogen, Grand Island, NY) і пеніцилін-стрептоміцин (Mediatech). Клітини висівали при $1,0 \times 10^6$ /мл в плоскодонні 96-ямкові планшети в присутності тільки середовища, TSLP (0,1 нг/мл) або комбінації TSLP і нейтралізуючого mAb проти TSLP (антитіло

1 або антитіло 4). Супернатанти культури спленоцитів збирали після 120 годин культивування, зберігали замороженими при -20 °C і аналізували рівні білка MDC з використанням Human MDC ELISA (R&D Systems).

5 Результати підсумовані в таблиці 9. Результати окремих експериментів наведені в окремих рядках.

Таблиця 9

TSLP	IC ₅₀ (мкг/мл)	
	Антитіло 1	Антитіло 4
Цино	0,012	0,012
Цино	0,030	0,028, 0,008
Цино	0,018	0,054
Цино	0,033	0,023

Антитіло 1: Батьківське антитіло 23B12 щура

Антитіло 4: Гуманізоване mAb 23B12 проти hu TSLP (містить важкий ланцюг SEQ ID NO: 11 і легкий ланцюг SEQ ID NO: 12 з даної заявки)

10 Багато модифікацій і варіацій даного винаходу можна виконувати, не відступаючи від його суті і об'єму, як повинно бути зрозуміло фахівцям в даній галузі. Конкретні варіанти здійснення, описані в цьому документі, запропоновані тільки як приклад, і винахід повинен бути обмежений положеннями прикладеної формули винаходу нарівні з повним об'ємом еквівалентів, на які дає право така формула винаходу; і винахід не повинний бути обмежений конкретними варіантами здійснення, які представлені в цьому документі як приклади.

15 Цитування наведених вище публікацій або документів не призначене як визнання того, що будь-що з попереднього є таким, що стосується відомого рівня техніки, і також це не складає якого-небудь визнання відносно змісту або дати цих публікацій або документів. Патенти США і інші публікації, згадані в цьому документі, таким чином, включені за допомогою посилання.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

20 Даний винахід стосується будь-якого ізольованого поліпептиду або ізольованої нуклеїнової кислоти, що містить будь-яку з наступних амінокислотних або нуклеотидних послідовностей, відповідно:

SEQ ID NO:	Послідовність
1	GYIFTDYAMH
2	TFIPLDTSYAKKFQG
3	MGVTHSYVMDA
4	RASQPISISVH
5	FASQISIS
6	QQTFSLPYT
7	амінокислотна послідовність варіабельного важкого ланцюга QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGTFIPLDTSYAKK FQGRVTMTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARMGVTHSYVMDAWGQGTLLVTSS
8	амінокислотна послідовність варіабельного легкого ланцюга EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQPISISVHWYQQKPGQAPRLLIYFASQISGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTFSLPYTFGQGTKEIKRT
9	послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує варіабельний важкий ланцюг cagggtgcagctggcagctggcgccgaagtgaaagaacctggcgccctcgtaagggtgctgcgaaggcctccggctacatcttca ccgactacgccatgcactggctggcgccaggctccaggacaggggcctggaatggatgggcacctcatccctctgctggacaccttga ctacgccagaattccagggcagagtgacctgacctgacctccacacctccacgcctacatggaaactgcgggtccctggagatc cgacgacacggccgtgactactgcggcgatggcggtgacacactctacgtgatggacgttggggccaggccacctggtcac cgtgctctcc
10	послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує варіабельний легкий ланцюг gagatcgtgctgaccagctccctggcacctgtctgtctccggcgagagagccacctgctcggggcctccagcctatctcc atctccgtgactggtatcagcagaagccaggacaggccctcggtgctgactactctgcttctcagctatctctggcatccctgacgg gttctccggctctggcctccggcaccgacttaccctgaccttccggctggaaccttgcgggtgacttgcgggtgacttgcggcagac cttctcccttctacacttggccaggccaccaagggtggagatcaagcgtgacg
11	амінокислотна послідовність важкого ланцюга QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYIFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGTFIPLDTSYAKK FQGRVTMTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARMGVTHSYVMDAWGQGTLLVTSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD TL MISRTPEVTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQD WLVNGKEYCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSL SPGK
12	амінокислотна послідовність легкого ланцюга EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQPISISVHWYQQKPGQAPRLLIYFASQISGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTFSLPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13	послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує важкий ланцюг cagggtgcagctggcagctggcgccgaagtgaaagaacctggcgccctcgtaagggtgctgcgaaggcctccggctacatcttca ccgactacgccatgcactggctggcgccaggctccaggacaggggcctggaatggatgggcacctcatccctctgctggacaccttga ctacgccagaattccagggcagagtgacctgacctgacctccacacctccacgcctacatggaactgcgggtccctggagatc cgacgacacggccgtgactactgcggcgatggcggtgacacactctacgtgatggacgttggggccaggccacctgggtcac cgtgctccgctagcaccaggccctccgtgttccctctggcccttctcccaagtctaccttggcggaacgctgcttgggtgct ggtcaaggactacttccctgagcctgtgacagcttcttgaactctggcgccctgacctccggcggtgcacaccttccctgctgctgact ctagtgccgtgactccctgctccctggctgacagtgcttcatctccctggccacccagacacctgacatgcaagtgaaaccaagcc ttcaaaccaagggtggacaagaagggtgagcctaagctcgtgcgaagaagccacacctgtctccatgcccctgacctgactgctg ggcggaacctccgtgttccctgttcccttaagcctaaggacacctgtatgactcccggaacctgaagtacgtgctggtggtgac gtgtccacgaggaccagaagtgagttcaattggtgacgtggcggtggaggtgcacaacgccaagacaaagcctcgggagg aacagtaacactccactcagggtggtgctgctgacgtgctgacacgagtgctgacggcgaagaataacagtgcaagg tgtccacaaggccctgctgcccctatcgaaaagaccatctccaaaggccaaaggccagccaagagaacctcagggtgacacctg cctccctcgggacgagctgaccaagaaccagggtgctcctgacatgctgtgcaagggttctacacctccgatatcgccgtgagtg gagtgtaacggccagcctgagaacaactacaagaccacctcctgctggtgactccgacggctccttctctgactacacagtgac gtggacaagtcccggtggcagcagggaacagtgcttctcgtcctgctgacagaggccctgcacaaccactacacccaagtgac ctgctcctgctcctggcaag

14	послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує легкий ланцюг gagatcgtgctgaccagctccctggcacctgtctgtctccggcgagagagccacctgctcggggcctccagcctatctcc atctccgtgactggtatcagcagaagccaggacaggccctcggtgctgactactctgcttctcagctatctctggcatccctgacgg gttctccggctctggcctccggcaccgacttaccctgaccttcccggtggaacctgaggacttccgggtgactactgcccagcagac cttctccctgcttacccttggccagggcaccaagggtggagatcaagcgtacgggtggcgtcttccgtgttacttctccctccg acgagcagctgaagtcggcaccgctctgtctgctgctgaacaacttaccctcgggaggccaagggtcagtggaagggtgga caacgcccgtgacgtccggcaactccagggaatccgtaccgagcaggactccaaggacttacccttccctgcttccacacctgacc ctgtccaaggccgactacgagaagcacaagggtgacgcctgcgaagtgacccaccaggccgtgctatctccagtgactaagtcttca accggggcgagtg
15	MAVLGLLFLVTFPSCVLS
16	MAPVQLLGLLVFLPAMRC

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> SCHERING CORPORATION

<120> СКОНСТРУЙОВАНЕ АНТИТІЛО ПРОТИ TSLP

<130> BP2009.7093

<140>

<141>

<150> 61/297,008

<151> 2010-01-21

<150> 61/258,051

<151> 2009-11-04

<160> 16

<170> PatentIn версії 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка=«Опис штучної послідовності: синтетичний пептид»

<400> 1

Gly	Tyr	Ile	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ala	Met	His
1				5					10

<210> 2

<211> 17

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка=«Опис штучної послідовності: синтетичний пептид»

<400> 2

Thr	Phe	Ile	Pro	Leu	Leu	Asp	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln
1				5					10					15	

Gly

<210> 3

<211> 11

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка=«Опис штучної послідовності: синтетичний пептид»

```

<400> 3
Met Gly Val Thr His Ser Tyr Val Met Asp Ala
1           5           10

<210> 4
<211> 11
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка=«Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид»

<400> 4
Arg Ala Ser Gln Pro Ile Ser Ile Ser Val His
1           5           10

<210> 5
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка=«Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид»

<400> 5
Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser
1           5

<210> 6
<211> 9
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка=«Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид»

<400> 6
Gln Gln Thr Phe Ser Leu Pro Tyr Thr
1           5

<210> 7
<211> 120
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка=«Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид»

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

```


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

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

Gly Thr Phe Ile Pro Leu Leu Asp Thr Ser Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Gly Val Thr His Ser Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 109
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка=«Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид»

<400> 8
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Pro Ile Ser Ile Ser
20 25 30

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

Tyr Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Phe Ser Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 9
<211> 360
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка=«Опис штучної послідовності: синтетичний
полінуклеотид»

<400> 9
caggtgcagc tggatgcagc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccctc cgtgaaggtg 60
tcttgcaagg cctccggcta catcttcacc gactacgcca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggacagg gcttggaaatg gatgggcacc ttcacccctc tgctggacac ctctgactac 180
gccagaaat tccaggggcag agtgaccatg accgcccaca cctccacctc caccgcctac 240
atggaaactgc ggtccctgag atccgacgac accgcccgtgt actactgcgc ccggatgggc 300
gtgacacact cctacgtgat ggacgcttg ggccagggca ccctgggtcac cgtgtcctcc 360

<210> 10
<211> 327
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка=«Опис штучної послідовності: синтетичний
полінуклеотид»

<400> 10
gagatcgtgc tgaccagtc ccctggcacc ctgtctctgt ctcccggcga gagagccacc 60
ctgtcctgcc ggccctccca gcctatctcc atctccgtgc actggatca gcagaagcca 120
ggacaggccc ctccgctgct gatctacttc gcttctcagt ctatctctgg catccctgac 180
cgggttctccg gctctggctc cggcaccgac ttcaccctga ccctctcccg gctggaacct 240
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag accttctccc tgccttacac cttcgggccag 300
ggcaccsaagg tggagatcaa gcgtacg 327

<210> 11
<211> 450
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка=«Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид»

<400> 11

```

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

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

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

Gly Thr Phe Ile Pro Leu Leu Asp Thr Ser Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
50           55           60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85           90           95

Ala Arg Met Gly Val Thr His Ser Tyr Val Met Asp Ala 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 Lys 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 Asp Glu Leu 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> 12
<211> 214
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка=«Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид»

<400> 12
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

```

```

'1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Pro Ile Ser Ile Ser
      20           25           30

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

Tyr Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
      50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
      65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Phe Ser Leu Pro Tyr
      85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
      100          105          110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
      115          120          125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
      130          135          140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
      145          150          155          160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
      165          170          175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
      180          185          190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210

```

```

<210> 13
<211> 1350
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<221> джерело
<223> /примітка=«Опис штучної послідовності: синтетичний
        полінуклеотид»

```

<400> 13
caggtgcagc tggcgagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccctc cgtgaagggtg 60
tcctgcaagg cctccggcta catcttcacc gactacgcca tgcactgggt cgcgcaggct 120
ccaggacagg gcctggaatg gatgggcacc ttcattccctc tgctggacac ctctgactac 180
gccagaaat tccagggcag agtgaccatg accgcccaga cctccacctc caccgcctac 240
atggaactgc ggtccctgag atccgacgac accgcccgtg actactgcgc cgggatgggc 300
gtgacacact cctacgtgat ggacgcttg ggccagggca ccctggtcac cgtgtcctcc 360
gctagcacca agggcccttc cgtgttcct ctggccctt cctccaagtc tacctctggc 420
ggcaccgctg ctctgggctg tctggtaag gactacttc ctgagcctgt gacagtctct 480
tggaactctg gcgcctgac ctccggcgtg cacaccttc ctgccgtgct gcagtctagt 540
ggcctgtact ccctgtctc cgtggtcaca gtgccttcac catccctggg caccagacc 600
tacatctgca acgtgaacca caagccttc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagcct 660
aagtctctgc acaagaccca cacctgtcct ccatgccctg cccctgagct gctgggcgga 720
ccctccgtgt tcctgttccc tcctaagcct aaggacacc tgatgatctc cgggaccct 780
gaagtgaact gcgtgggtgt ggacgtgtcc cagaggacc cagaagtga gttcaattgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ctggggagga acagtacaac 900
tccacctacc ggggtggtgc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 960
gaatacaagt gcaagggtgc caacaaggcc ctgcctgccc ctatcgaaaa gaccatctcc 1020
aaggccaagg gccagccaag agaacctcag gtgtacaccc tgcctccctc tcgggacgag 1080
ctgaccaaga accagggtgc cctgacatgc ctggtaagg gcttctaccc ttccgatatc 1140
gccgtggagt gggagtctaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac ccctcctgtg 1200
ctggactccg acggctcctt ctctctgtac tccaagctga ccgtggacaa gtcccgggtg 1260
cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg cctgcacaa ccactacacc 1320
cagaagtccc tgtccctgtc tcctggcaag 1350

<210> 14
<211> 642
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка-«Опис штучної послідовності: синтетичний
полінуклеотид»

<400> 14
gagatcgtgc tgaccagtc ccctggcacc ctgtctctgt ctcccgccga gagagccacc 60
ctgtcctgcc gggcctccca gcctatctcc atctccgtgc actggtatca gcagaagcca 120

```

ggacaggccc ctcggtgct gatctacttc gcttctcagt ctatctctgg catccctgac      180
cggttctccg gctctggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatctcccg gctggaacct      240
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag accttctccc tgccttacac cttcggccag      300
ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gccgtctcctt ccgtgttcat cttccctccc      360
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tctgtcgtct gcctgtgtaa caacttctac      420
cctcgggagg ccaaggtgca gtggaagggt gacaacgccc tgcagtccgg caactcccag      480
gaatccgtca ccgagcagga ctccaaggac tctacctact ccctgtcttc caccctgacc      540
ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgtc ccaccagggc      600
ctgtcatctc cagtgtactaa gtctttcaac cggggcgagt gc                          642

```

```

<210> 15
<211> 19
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<221> джерело
<223> /примітка=«Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид»

```

```

<400> 15
Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
1           5           10           15

```

Val Leu Ser

```

<210> 16
<211> 19
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

```

```

<220>
<221> джерело
<223> /примітка=«Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид»

```

```

<400> 16
Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala
1           5           10           15

```

Met Arg Cys

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, яке специфічно зв'язує TSLP людини, що містить:

варіабельну область важкого ланцюга або її TSLP-зв'язувальний фрагмент, при цьому вказана варіабельна область важкого ланцюга містить: послідовність CDR-H1, що містить SEQ ID NO: 1, послідовність CDR-H2, що містить SEQ ID NO: 2, і послідовність CDR-H3, що містить SEQ ID
- 10 NO: 3; і

варіабельну область легкого ланцюга антитіла або її TSLP-зв'язувальний фрагмент, при цьому вказана варіабельна область легкого ланцюга містить: послідовність CDR-L1, що містить SEQ ID NO: 4, послідовність CDR-L2, що містить SEQ ID NO: 5, і послідовність CDR-L3, що містить SEQ ID NO: 6.
- 15 2. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 1, де варіабельна область важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7.

3. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 1, де варіабельна область важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7 і варіабельна область легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8.
4. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 1, яке містить SEQ ID NO: 11 і SEQ ID NO: 12.
5. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за п. 1, де антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент може бути експресоване з вектора, депонованого під номером депозиту ATCC PTA-10482.
6. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 1-5, де антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент являє собою гуманізоване антитіло або його TSLP-зв'язувальний фрагмент.
7. Антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 1-6, де антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент являє собою TSLP-зв'язувальний фрагмент антитіла, вибраний з групи, що складається з Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂ і діатіла.
8. Виділена нуклеїнова кислота, що кодує антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 1-7.
9. Експресуючий вектор, що містить нуклеїнову кислоту за п. 8.
10. Клітина-хазяїн, що містить експресуючий вектор за п. 9.
11. Спосіб отримання поліпептиду, який включає:
- 20 культивування клітини-хазяїна за п. 10 в культуральному середовищі в умовах, в яких відбувається експресія послідовності нуклеїнової кислоти, тим самим продукуючи поліпептиди, що містять варіабельні області легкого і важкого ланцюга; і витягання поліпептидів з клітини-хазяїна або середовища для культивування.
12. Спосіб супресії імунної відповіді у суб'єкта-людини, що включає введення суб'єкту, який потребує цього, антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за будь-яким з пп. 1-7 або його TSLP-зв'язувального фрагмента в кількості, ефективній для блокування біологічної активності TSLP.
- 25 13. Композиція, що містить антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент за будь-яким з пп. 1-7 в поєднанні з фармацевтично прийнятним носієм або розріджувачем.
- 30 14. Застосування антитіла або його антигензв'язувального фрагмента за будь-яким з пп. 1-7 або його TSLP-зв'язувального фрагмента для отримання лікарського засобу для лікування запальних захворювань, фіброзу, запального захворювання кишечника або ходжкінської лімфоми.
15. Застосування за п. 14, де запальне захворювання являє собою алергічний риніт, алергічну астму, алергічний кон'юнктивіт або atopічний дерматит.
- 35 16. Експресуючий вектор, депонований під номером депозиту ATCC PTA-10482.
17. Клітина-хазяїн, що містить експресуючий вектор за п. 16.

Послідовність 1 20 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGTFIPLDTSY
 Послідовність 2 1 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGTFIPLDTSY

Послідовність 1 80 AQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARMGVTHSYVMDAWGQGLTVSS
 Послідовність 2 61 NQNFQGRVTMTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARMGVTHSYVMDAWGQGLTVSS
 * * *****

Послідовність 1 140 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 Послідовність 2 121 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

Послідовність 1 200 GLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 Послідовність 2 181 GLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG

Послідовність 1 260 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 Послідовність 2 241 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN

Послідовність 1 320 STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
 Послідовність 2 301 STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE

Послідовність 1 380 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 Послідовність 2 361 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW

Послідовність 1 440 QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
 Послідовність 2 421 QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 1

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601