



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114507281 A

(43) 申请公布日 2022. 05. 17

(21) 申请号 202210150111.5

(22) 申请日 2016.09.07

(30) 优先权数据

62/216,050 2015.09.09 US

62/342,511 2016.05.27 US

(62) 分案原申请数据

201680065214.4 2016.09.07

(71) 申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 J-M·R·隆多 M·J·爱德华兹

D·米勒 D·黄 R·海米

H-P·科诺普夫 K·古普塔

G·A·范黑克 N·豪布斯特

B·安德洛埃

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 黄革生 隋晓平

(51) Int.Cl.

C07K 16/24 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 9/72 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 47/22 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

A61K 47/04 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 11/02 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

权利要求书4页 说明书88页

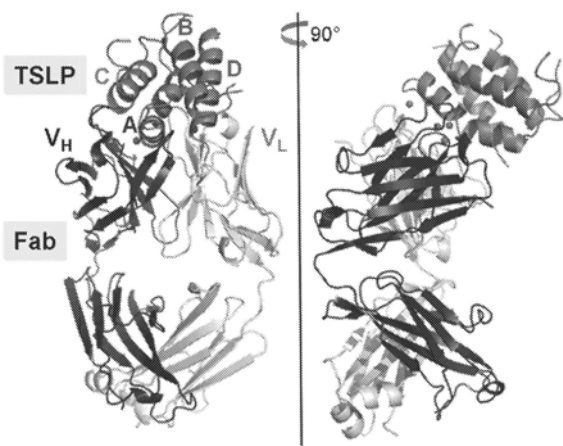
序列表24页 附图8页

(54) 发明名称

胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP)-结合分子
及该分子的使用方法

(57) 摘要

本发明提供特异性结合胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP) 的分子 (例如抗体或抗体片段), 包含这些分子的组合物, 及使用及产生这些分子的方法。



1. 一种特异性结合人胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP) 的分子, 其选自以下中的任一:
 - a) 包含以下的分子:
 - 包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的重链互补决定区1 (HCDR1);
 - 包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的重链互补决定区2 (HCDR2);
 - 包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的重链互补决定区3 (HCDR3);
 - 包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的轻链互补决定区1 (LCDR1);
 - 包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的轻链互补决定区2 (LCDR2); 及
 - 包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的轻链互补决定区3 (LCDR3);
 - b) 包含以下的分子:
 - 包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的HCDR1;
 - 包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的HCDR2;
 - 包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的HCDR3;
 - 包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的LCDR1;
 - 包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的LCDR2; 及
 - 包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的LCDR3;
 - c) 包含以下的分子:
 - 包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的HCDR1;
 - 包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的HCDR2;
 - 包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的HCDR3;
 - 包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的LCDR1;
 - 包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的LCDR2; 及
 - 包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的LCDR3;
 - d) 分子, 其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:7的重链可变区及含有氨基酸序列SEQ ID NO:17的轻链可变区;
 - e) 分子, 其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:22的重链及含有氨基酸序列SEQ ID NO:25的轻链;
 - f) 分子, 其包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:9的重链及含有氨基酸序列SEQ ID NO:19的轻链。
2. 如权利要求1所述的分子, 其中所述分子为单克隆抗体。
3. 如权利要求1至2中任一项所述的分子, 其中所述分子为选自Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、微型抗体或双抗体的抗体片段。
4. 如权利要求1至3中任一项所述的分子, 其中所述分子以小于100pM的解离常数 (K_D) 结合人TSLP, 更具体地其中所述分子以小于10pM的解离常数 (K_D) 结合人TSLP。
5. 一种药物组合物, 其包含如权利要求1至4中任一项所述的分子及至少一种药学上可接受的赋形剂。
6. 如权利要求5所述的药物组合物, 其中所述分子为所述组合物的约5%至约95%、或约10%至约90%、或约15%至约85%、或约20%至约80%、或约25%至约75%、或约30%至约70%、或约40%至约60%、或约40-50% (w/w)。
7. 如权利要求5所述的药物组合物, 其中所述组合物包含壳形成剂。

8. 如权利要求7所述的药物组合物,其中所述壳形成剂为三亮氨酸或亮氨酸。
9. 如权利要求8所述的药物组合物,其中所述三亮氨酸或亮氨酸为所述组合物的约10-75% (w/w)。
10. 如权利要求8所述的药物组合物,其中所述三亮氨酸为所述组合物的约10-30% (w/w),或其中所述亮氨酸为所述组合物的约50-75% (w/w)。
11. 如权利要求5所述的药物组合物,其中所述组合物包含至少一种玻璃形成赋形剂。
12. 如权利要求11所述的药物组合物,其中所述至少一种玻璃形成赋形剂选自组氨酸、海藻糖、甘露醇、蔗糖或柠檬酸钠。
13. 如权利要求12所述的药物组合物,其中所述至少一种玻璃形成赋形剂选自海藻糖或海藻糖与甘露醇的混合物。
14. 如权利要求11所述的药物组合物,其中所述玻璃形成赋形剂为所述组合物的约15-35% (w/w)。
15. 如权利要求5所述的药物组合物,其中所述组合物包含缓冲液。
16. 如权利要求15所述的药物组合物,其中所述缓冲液选自组氨酸、甘氨酸、乙酸盐或磷酸盐缓冲液。
17. 如权利要求16所述的药物组合物,其中所述缓冲液为所述组合物的约5-13%。
18. 如权利要求5所述的药物组合物,其中所述组合物配制为干粉制剂。
19. 如权利要求18所述的药物组合物,其中所述组合物配制为适于吸入的干粉制剂。
20. 如权利要求5所述的药物组合物,其中所述组合物包含:包含壳及核心的喷雾干燥颗粒,其中所述壳包含三亮氨酸或亮氨酸,且所述核心包含:
 - i) 分子、海藻糖、甘露醇及缓冲液;或
 - ii) 分子、海藻糖、缓冲液及HCl。
21. 如权利要求20所述的药物组合物,其中所述缓冲液选自组氨酸、甘氨酸、乙酸盐或磷酸盐缓冲液。
22. 一种包含喷雾干燥颗粒的药物组合物,所述喷雾干燥颗粒包含:
 - i) 包含海藻糖、甘露醇、组氨酸及TSLP结合分子的核心,或包含海藻糖、组氨酸、HCl及TSLP结合分子的核心,其中所述TSLP结合分子包含:
 - a) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的HCDR1;
包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的HCDR2;
包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的HCDR3;
包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的LCDR1;
包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的LCDR2;及
包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的LCDR3;或
 - b) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的HCDR1;
包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的HCDR2;
包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的HCDR3;
包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的LCDR1;
包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的LCDR2;及
包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的LCDR3;或

c) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:1的HCDR1;
包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的HCDR2;
包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的HCDR3;
包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的LCDR1;
包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的LCDR2;及
包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的LCDR3;

及

ii) 包含三亮氨酸或亮氨酸的壳。

23. 如权利要求22所述的药物组合物,其包含:

a) 40% (w/w) TSLP结合分子、25% (w/w) 三亮氨酸、30% (w/w) 组合重量的海藻糖与甘露醇,及5% (w/w) 组氨酸;

b) 50% (w/w) TSLP结合分子、15% (w/w) 三亮氨酸、2.6% (w/w) HCl、5.6% (w/w) 组氨酸,及26.8% (w/w) 组合重量的海藻糖与碱;或

c) 50% (w/w) TSLP结合分子、15% (w/w) 三亮氨酸、19.4% (w/w) 海藻糖、13.04% (w/w) 组氨酸及2.56% (w/w) HCl。

24. 一种试剂盒,其包含如权利要求1-4的分子或如权利要求5-21的药物组合物,及用于向受试者递送所述分子或药物组合物的装置。

25. 如权利要求24所述的试剂盒,其中所述装置递送呈雾化形式的分子或药物组合物。

26. 如权利要求25所述的试剂盒,其中所述装置为干粉吸入器。

27. 权利要求1-4任一项的分子或权利要求5-21任一项的药物组合物用作药物。

28. 权利要求1-4任一项的分子或权利要求5-21任一项的药物组合物,用于治疗有需要的受试者中的TSLP相关病症;更具体地其中TSLP相关炎症病症选自哮喘、慢性阻塞性肺病、过敏性鼻炎、过敏性鼻窦炎、过敏性结膜炎、嗜酸性粒细胞性食道炎及特应性皮炎。

29. 如权利要求27或28所述的分子或药物组合物用作药物或用于治疗有需要的受试者中的TSLP相关病症,其中所述分子配制为适于吸入的干粉制剂,更具体地其中所述分子通过干粉吸入器施用给所述受试者。

30. 如权利要求27或28所述的分子或药物组合物用作药物或用于治疗有需要的受试者中的TSLP相关病症,其中所述分子经口或鼻内施用给所述受试者。

31. 如权利要求30所述的分子或药物组合物用作药物或用于治疗有需要的受试者中的TSLP相关病症,其中所述分子以雾化形式施用给所述受试者。

32. 如权利要求27或28所述的分子或药物组合物用作药物或用于治疗有需要的受试者中的TSLP相关病症,其另外包含向所述受试者施用第二药物。

33. 如权利要求27或28所述的分子或药物组合物用作药物或用于治疗有需要的受试者中的TSLP相关病症,其中所述第二药物选自:皮质类固醇、支气管扩张剂、抗组织胺、抗白三烯及PDE-4抑制剂。

34. 一种核酸,其编码如权利要求1至4中任一项所述的分子。

35. 一种载体,其包含如权利要求34所述的核酸。

36. 一种宿主细胞,其包含如权利要求34所述的核酸或如权利要求35所述的载体。

37. 一种产生如权利要求1至4中任一项所述的分子的方法,所述方法包含:

培养表达编码所述分子的核酸的宿主细胞;及
自培养基收集所述分子。

38.一种用于制备包含如权利要求1至4中任一项所述的分子的干粉制剂的方法,所述方法包含:

(a) 提供包含如权利要求1至4中任一项所述的分子、三亮氨酸或亮氨酸、玻璃形成赋形剂及缓冲液的水性溶液;

(b) 在约120°C至约200°C (入口) 范围及55°C至约75°C (出口) 范围的温度下喷雾干燥步骤(a)的水性溶液以产生干粉颗粒;及

(c) 收集所述干粉颗粒。

39.如权利要求38所述的方法,其中所述缓冲液选自组氨酸、甘氨酸、乙酸盐或磷酸盐缓冲液。

40.如权利要求38所述的方法,其中所述玻璃形成赋形剂选自组氨酸、组氨酸HCl、海藻糖、甘露醇、蔗糖或柠檬酸钠。

41.如权利要求5所述的药物组合物,其中赋形剂:分子质量比大于0.5。

胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP) - 结合分子及该分子的使用 方法

本申请是申请日为2016年09月07日、发明名称为“胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP) - 结合分子及该分子的使用方法”的中国专利申请201680065214.4 (国际申请号PCT/IB2016/055336)的分案申请。

序列表

本发明包含以ASCII文本形式电子提交的序列表,其通过引用整体并入本文。所述ASCII副本创建于2016年8月23日,命名为PAT057035-WO-PCT_SL.txt,大小为46696字节。

技术领域

[0001] 本发明提供特异性结合胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP) 的分子 (例如抗体或抗体片段)、包含这些分子的组合物及使用且产生这些分子的方法。

背景技术

[0002] 胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP) 为通过异二聚体受体信号传导的细胞因子,该异二聚体受体由IL-7R α 亚基及与常见 γ 受体样链具有同源性的独特组分TSLP-R组成 (Pandey等人,Nat.Immunol.2000,1 (1):59-64)。TSLP由胸腺、肺、皮肤、肠及扁桃体中的上皮细胞以及气道平滑肌细胞、肺纤维母细胞及基质细胞表达 (Edwards,2008,Drug news&perspectives 21,312-316;He及Geha,2010,Annals of the New York Academy of Sciences 1183,13-24;Reche等人,2001,Journal of immunology 167,336-343)。这些细胞响应于促炎性刺激产生TSLP,且TSLP通过其对于多种先天性免疫细胞的活性而驱动过敏性炎症反应,所述先天性免疫细胞包括树突状细胞 (Soumelis等人,2002,Nature immunology 3,673-680)、单核细胞 (Reche等人,2001,Journal of immunology 167,336-343) 及肥大细胞 (Allakhverdi等人,2007,The Journal of Experimental Medicine 204,253-258)。已知TSLP-R及IL-7R α 均最高表达的细胞群体为髓样树突状细胞 (Reche等人,2001,Journal of immunology 167,336-343)。

[0003] TSLP可促进初始T细胞增殖且驱使其分化成表达高水平IL-4、IL-5及IL-13的Th2细胞 (Omori及Ziegler,2007,Journal of immunology 178,1396-1404)。已在哮喘肺上皮细胞及慢性特应性皮炎病灶中发现高水平的TSLP表达,表明TSLP在过敏性炎症中的作用 (Ziegler及Artis,2010,Nature immunology 11,289-293)。最新证据表明TSLP参与Th17细胞分化及Th17驱动的炎症过程 (Hartgring等人,2011,Arthritis and rheumatism 63,1878-1887;Tanaka等人,2009,Clinical and experimental allergy:Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology 39,89-100;Wu等人,2014,Journal of molecular and cellular cardiology 76,33-45)。慢性过敏性 (特应性) 哮喘常常通过Th2型炎症表征,而非过敏性哮喘炎症主要呈嗜中性,具有混合Th1及Th17细胞因子环境。哮喘中慢性炎症的后果包括支气管高反应性 (BHR)、粘液过度产生、气道壁重塑及气道变窄 (Lambrecht及Hammad,2014,Nature immunology 16,45-56)。TSLP表达为参与过

敏性哮喘反应的起始及维持/增强 (Wang等人, 2006, Immunity 24, 827-838)。最近, 还发现 TSLP 信号传导为记忆 T 细胞对局部抗原攻击的回忆反应所需的 (Wang等人, 2015, The Journal of allergy and clinical immunology 135, 781-791e783)。

发明内容

[0004] 在一个方面, 本文提供特异性结合人胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP) 的分子, 例如单克隆抗体或其抗体片段, 诸如 Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、微型抗体或双抗体。在一些实施方案中, TSLP 结合分子可包含: 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 4 的重链互补决定区 1 (HCDR1); 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 2 的重链互补决定区 2 (HCDR2); 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 3 的重链互补决定区 3 (HCDR3); 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 11 的轻链互补决定区 1 (LCDR1); 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 12 的轻链互补决定区 2 (LCDR2); 及含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 13 的轻链互补决定区 3 (LCDR3)。在一些实施方案中, TSLP 结合分子可包含含有以下的分子: 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 5 的 HCDR1; 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 6 的 HCDR2; 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 3 的 HCDR3; 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 14 的 LCDR1; 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 15 的 LCDR2; 及含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 16 的 LCDR3。

[0005] 在一些特定实施方案中, 该分子包含结合人 TSLP 且包含含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 4 的 HCDR1; 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 2 的 HCDR2; 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 3 的 HCDR3; 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 11 的 LCDR1; 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 12 的 LCDR2; 及含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 13 的 LCDR3 的抗体片段。在其他特定实施方案中, 该分子包含结合人 TSLP 且包含含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 5 的 HCDR1; 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 6 的 HCDR2; 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 3 的 HCDR3; 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 14 的 LCDR1; 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 15 的 LCDR2; 及含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 16 的 LCDR3 的抗体片段。

[0006] 在一些实施方案中, TSLP 结合分子可包含: 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 7 的重链可变区及含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 17 的轻链可变区。

[0007] 在一些实施方案中, TSLP 结合分子可包含: 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 22 的重链及含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 25 的轻链。在一些实施方案中, TSLP 结合分子可包含: 含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 9 的重链及含有氨基酸序列 SEQ ID NO: 19 的轻链。

[0008] 在一些实施方案中, TSLP 结合分子可包含具有至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、至少十二个、至少十三个、至少十四个、至少十五个、至少十六个、至少十七个、至少十八个、至少十九个或所有以下残基的互补位 (paratope): 重链序列 SEQ ID NO: 22 的 Thr28、Asp31、Tyr32、Trp33、Asp56、Glu101、Ile102、Tyr103、Tyr104、Tyr105 或轻链序列 SEQ ID NO: 25 的 Gly28、Ser29、Lys30、Tyr31、Tyr48、Asp50、Asn51、Glu52、Asn65 及 Trp92。

[0009] 在一些实施方案中, 本文提供特异性结合人 TSLP 的表位的分子, 其中该表位包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、至少十二个、至少十三个、至少十四个、至少十五个或所有以下残基: SEQ ID NO: 38 的 Lys38、Ala41、Leu44、Ser45、Thr46、Ser48、Lys49、Ile52、Thr53、Ser56、Gly57、Thr58、Lys59、Lys101、Gln145 及 Arg149。在一些实施方案中, 此类分子结合包含 SEQ ID NO: 38 的以下各组残基中的至少一组的表位: (a) Lys49 及 Ile52、(b) Gly57 及 Lys59、(c) Lys101

或(d) Gln145及Arg149。

[0010] 在一些实施方案中,TSLP结合分子为特异性结合人TSLP的人免疫球蛋白。在一些实施方案中,TSLP结合分子为单克隆抗体或选自Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、微型抗体或双抗体的抗体片段。在一些实施方案中,TSLP结合分子为特异性结合人TSLP的Fab,例如人或人源化Fab。

[0011] 在一些实施方案中,本文所述的分子以小于100pM的解离常数(K_D)结合人TSLP。在一些实施方案中,本文所述的分子以小于10pM的解离常数(K_D)结合人TSLP。

[0012] 在另一方面,本文提供包含至少一种本文所述的TSLP结合分子及至少一种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在一些实施方案中,赋形剂:TSLP结合分子质量比大于0.5。在一些实施方案中,TSLP结合分子为药物组合物的约5%至约95%、或约10%至约90%、或约15%至约85%、或约20%至约80%、或约25%至约75%、或约30%至约70%、或约40%至约60%、或约40-50% (w/w)。在一些实施方案中,药物组合物包含壳形成剂,诸如三亮氨酸或亮氨酸。在一些实施方案中,三亮氨酸或亮氨酸为组合物的约10-75% (w/w)。在一些实施方案中,三亮氨酸为组合物的约10-30% (w/w)。在其他实施方案中,亮氨酸为组合物的约50-75% (w/w)。在一些实施方案中,药物组合物包含至少一种玻璃形成赋形剂,其中该玻璃形成赋形剂选自组氨酸、海藻糖、甘露醇、蔗糖或柠檬酸钠。在一些实施方案中,至少一种玻璃形成赋形剂为海藻糖或海藻糖与甘露醇的混合物。在一些实施方案中,玻璃形成赋形剂为组合物的约15-35% (w/w)。在一些实施方案中,药物组合物包含缓冲液,诸如组氨酸、甘氨酸、乙酸盐或磷酸盐缓冲液。在一些实施方案中,缓冲液为组合物的约5-13%。

[0013] 在一些实施方案中,本文所提供的药物组合物配制为干粉制剂,例如适于吸入的干粉制剂。

[0014] 在一些实施方案中,本文所提供的药物组合物包含具有壳及核心的喷雾干燥颗粒,其中壳包含三亮氨酸或亮氨酸,核心包含:(i) TSLP结合分子、海藻糖、甘露醇及缓冲液;或(ii) TSLP结合分子、海藻糖、缓冲液及HCl。缓冲液可为组氨酸、甘氨酸、乙酸盐或磷酸盐缓冲液。

[0015] 在一些实施方案中,本文所提供的药物组合物包含喷雾干燥颗粒,所述喷雾干燥颗粒包含:(i) 包含三亮氨酸或亮氨酸的壳;及(ii) 包含海藻糖、甘露醇、组氨酸及TSLP结合分子的核心,或包含海藻糖、组氨酸、HCl及TSLP结合分子的核心,其中TSLP结合分子为抗体Fab片段,该片段包含:(a) 含有氨基酸序列SEQ ID NO:4的HCDR1;含有氨基酸序列SEQ ID NO:2的HCDR2;含有氨基酸序列SEQ ID NO:3的HCDR3;含有氨基酸序列SEQ ID NO:11的LCDR1;含有氨基酸序列SEQ ID NO:12的LCDR2;及含有氨基酸序列SEQ ID NO:13的LCDR3;或(b) 含有氨基酸序列SEQ ID NO:5的HCDR1;含有氨基酸序列SEQ ID NO:6的HCDR2;含有氨基酸序列SEQ ID NO:3的HCDR3;含有氨基酸序列SEQ ID NO:14的LCDR1;含有氨基酸序列SEQ ID NO:15的LCDR2;及含有氨基酸序列SEQ ID NO:16的LCDR3。

[0016] 在一些实施方案中,本文所提供的药物组合物包含:

(a) 40% (w/w) TSLP结合分子、25% (w/w) 三亮氨酸、30% (w/w) 组合重量的海藻糖与甘露醇及5% (w/w) 组氨酸;

b) 50% (w/w) TSLP结合分子、15% (w/w) 三亮氨酸、2.6% (w/w) HCl、5.6% (w/w) 组氨酸及26.8% (w/w) 组合重量的海藻糖与碱;或

c) 50% (w/w) TSLP结合分子、15% (w/w) 三亮氨酸、19.4% (w/w) 海藻糖、13.04% (w/w) 组氨酸及2.56% (w/w) HCl。

[0017] 本文还提供编码任何本文所述的TSLP结合分子的核酸、包含此类核酸的载体及包含该核酸或该载体的宿主细胞。

[0018] 还提供产生本文所述的TSLP结合分子的方法。此类方法可包括(a) 培养表达编码分子的核酸的宿主细胞;及(b) 自培养基收集该分子。

[0019] 在另一方面,本文提供包含至少一种本文所述的TSLP结合分子或药物组合物的试剂盒,及用于向受试者递送该分子或药物组合物的装置。在一些实施方案中,装置可递送呈雾化形式的分子或药物组合物。在一些实施方案中,装置为干粉吸入器。

[0020] 在另一方面,本文提供治疗有需要的受试者(例如人患者)的TSLP相关病症的方法,其通过向该受试者施用治疗有效量的任何本文所述的TSLP结合分子或药物组合物。还提供如本文所述用于治疗有需要的受试者的TSLP相关病症的分子或药物组合物。还包括本文所述的TSLP结合分子或药物组合物治疗有需要的受试者的TSLP相关病症的用途。本发明还包括本文所述的分子在制备用于治疗有需要的受试者的TSLP相关病症的药物中的用途。

[0021] TSLP相关炎症病症可为哮喘、慢性阻塞性肺病、过敏性鼻炎、过敏性鼻窦炎、过敏性结膜炎、嗜酸性粒细胞性食道炎或特应性皮炎中的任一者。在一些实施方案中,TSLP相关炎症病症为哮喘。在一些实施方案中,TSLP结合分子配制为适于吸入的干粉制剂。在一些实施方案中,TSLP结合分子例如以雾化形式经口或鼻内施用给受试者。在一些实施方案中,TSLP结合分子通过干粉吸入器施用给受试者。

[0022] 在一些实施方案中,治疗TSLP相关病症的方法或TSLP结合分子的用途另外包括向需要治疗的受试者施用第二药物。第二药物可为皮质类固醇、支气管扩张剂、抗组胺剂、抗白三烯剂或PDE-4抑制剂。

[0023] 在另一方面,本文提供用于制备包含本文所述的TSLP结合分子的干粉制剂的方法。此类方法可包括以下步骤中的一个或多个:(a) 提供包含如本文所述的TSLP结合分子、三亮氨酸或亮氨酸、玻璃形成赋形剂及缓冲液的水性溶液;(b) 在约120℃至约200℃(入口)范围及55℃至约75℃(出口)的温度下喷雾干燥步骤(a)的水性溶液以产生干粉颗粒;及(c) 收集所述干粉颗粒。在一些实施方案中,缓冲液系选自组氨酸、甘氨酸、乙酸盐或磷酸盐缓冲液。在一些实施方案中,玻璃形成赋形剂选自组氨酸、组氨酸HCl、海藻糖、甘露醇、蔗糖或柠檬酸钠。

[0024] 本发明的一个或多个实施方案的详情阐述于附图及以下描述中。本发明的其他特征、目标及优势将自描述及附图以及自权利要求显而易见。

附图说明

[0025] 图1A展示抗人TSLP Fab1重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:22),其中CDR加下划线(如通过Kabat所定义)且位于抗体-抗原界面的残基经*标记。图1B展示抗人TSLP Fab1轻链的氨基酸序列(SEQ ID NO:25),其中CDR加下划线(如通过Kabat所定义)且位于抗体-抗原界面的残基经*标记。

[0026] 图2展示用于结晶学研究的重组人TSLP的氨基酸序列(SEQ ID NO:38),其中二级结构要素展示在氨基酸序列下方。方块表示 α -螺旋 α_A 、 α_B 、 α_C 及 α_D ,且粗线表示环区。成熟人

TSLP始于Tyr29。此处所用的构建体具有N端六组氨酸标签(SEQ ID NO:40)(残基15-20),接着为HRV-3C蛋白酶(PreScission)识别位点(残基21-28)及由克隆产生的残基11-14。Asn64及Asn119为潜在的N-连接糖基化位点;且残基127-130构成弗林蛋白酶(furin)裂解位点。

[0027] 图3为展示TSLP中和对于用抗原攻击的卵白蛋白致敏小鼠的肺炎症的作用的条形图。用卵白蛋白(OVA)或生理盐水加矾致敏的小鼠在致敏之前1小时接受抗鼠TSLP或同种型对照抗体的静脉内施用。所有小鼠在第21天经OVA攻击且在24小时处死。值表示BAL内的总体及分化细胞计数的平均值 $\pm$ SEM(标准误差平均值)。使用未配对学生T检验进行统计学分析。经同种型处理的生理盐水致敏及OVA致敏小鼠间的显著差异 $p<0.05$ 由(*)标示且 $p<0.01$ 由(**)标示。经同种型及抗TSLP抗体处理的OVA致敏小鼠间的差异 $p<0.05$ 由(#)标示。[PMN:多形核细胞(中性粒细胞);Eos:嗜酸性粒细胞;MO:单核细胞;Lymph:淋巴细胞;TCC:总细胞计数。]

[0028] 图4A-图4C为一系列条形图,其展示TSLP中和显著减少卵白蛋白致敏、抗原攻击的小鼠的肺内IL-13(图4A)、嗜酸细胞活化趋化因子-2(CCL24,图4B)及胸腺及活化调节的趋化因子(TARC、CCL17,图4C)的水平。用OVA(或生理盐水)加矾致敏的小鼠在致敏前1小时接受抗鼠TSLP或同种型对照抗体的静脉内施用。所有小鼠在第21天经OVA攻击且在24小时处死。值表示通过特异性ELISA测量的BAL中调节物的平均值 $\pm$ SEM水平。使用未配对学生T检验进行统计学分析。经同种型处理的生理盐水致敏及OVA致敏小鼠间的显著差异 $p<0.05$ 由(*)标示且 $p<0.01$ 由(**)标示。经同种型及抗TSLP抗体处理的OVA致敏小鼠间的差异 $p<0.05$ 由(#)标示。

[0029] 图5为展示猴的总抗TSLP Fab1的平均血清浓度-时间分布的线图。

[0030] 图6A及图6B为展示猴在最后一次吸入剂量后1小时(1、10、20毫克/公斤/天吸入组)或6天(1毫克/公斤IV+20毫克/公斤/天吸入组)的BAL(6A)或肺组织匀浆(6B)中总抗TSLP Fab1的平均浓度的条形图。

[0031] 图7说明与抗TSLP Fab1复合的人TSLP的综览。TSLP螺旋自N端至C端标记A至D。

[0032] 图8展示由抗TSLP Fab1靶向的TSLP表位。图的上部展示在 $4.0 \text{ \AA}$ 距离内非氢原子间的直接分子间接触的数目,且下部展示在复合物形成后溶剂可及表面减少。TSLP的氨基酸序列(SEQ ID NO:41)显示于横轴上。

[0033] 图9展示TSLP表位的抗体视图。TSLP以带式草图展示。涉及与Fab1直接接触($4.0 \text{ \AA}$ 距离截止)的所有氨基酸残基以球-棍图展示。

[0034] 图10A及图10B展示抗TSLP Fab1的重链(SEQ ID NO:42)(A)及轻链(SEQ ID NO:43)(B)互补位。图的上部展示非氢原子之间的直接分子间接触($\leq 4.0 \text{ \AA}$)的数目,且下部展示在复合物形成后溶剂可及表面减少。重链或轻链可变结构域的氨基酸序列显示于横轴上。

[0035] 图11A-图11C展示抗TSLP Fab1的作用模式。图11A为小鼠细胞外信号传导复合物的视图,其中IL-7R α 呈黑色且TSLPR呈淡灰色。图11B为人TSLP-Fab1复合物在与图11A相同的定向中的视图。图11C为基于细胞因子C α 原子的两种复合物的结构重迭图。小鼠信号传导复合物呈淡灰色,人TSLP-Fab1复合物呈黑色。

[0036] 图12为说明在较高赋形剂:蛋白质比率下的制剂改进抗TSLP Fab1的物理化学稳定性的散布图,如由蛋白质聚集率减小所示。

具体实施方式

定义

[0037] 如本说明书及权利要求中所用,除非上下文另外明确指示,否则单数形式“一(a/an)”及“该”包括多个参考物。举例而言,术语“细胞”包括多个细胞,包括其混合物。

[0038] 所有数值标示(例如pH、温度、时间、浓度及分子量,包括范围)为以增量0.1改变(+)或(-)的近似值。应了解,尽管未必总明确陈述,但所有数值标示前存在术语“约”。还应了解,尽管未必总明确陈述,但本文所述的试剂仅为实例且其等同物为本领域中已知的。

[0039] 如本文所用,“TSLP”(还称为“胸腺基质淋巴细胞生成素”)指响应于促炎性刺激而由非造血细胞产生的细胞因子。人TSLP基因定位于染色体位置5q22.1,且TSLP基因的基因组序列可见于GenBank NC_000005.10。由于替代性拼接,两种TSLP亚型存在于人中。两种人TSLP亚型的蛋白质及mRNA序列在表1中列出。

表1. TSLP氨基酸及mRNA序列

物种	亚型	GeneBank 登录编号	序列
智 人 (Homo sapiens)	TSLP 亚 型 1 氨基酸	NP_14902 4.1	MFPFALLYVLSVSFRKIFILQLVGLVLTYDFTNC DFEKIKAAYLSTISKDLITYMSGTKSTEFNNTVS CSNRPHCLTEIQSLTFNPTAGCASLAKEMFAMK TKAALAIWCPGYSETQINATQAMKRRKRKVT TNKCLEQVSQLQGLWRRFNRPLLKQQ (SEQ ID NO: 27)
智人	TSLP 亚 型 1 mRNA	NM_0330 35.4	GCAGCCAGAA AGCTCTGGAG CATCAGGGAG ACTCCAACCTT AAGGCAACAG CATGGGTGAA TAAGGGCTTC CTGTGGACTG GCAATGAGAG

			GCAAAACCTG GTGCTTGAGC ACTGGCCCCCT AAGGCAGGCC TTACAGATCT CTTACACTCG TGGTGGGAAG AGTTTAGTGT GAAACTGGGG TGGAATTGGG TGTCCACGTA TGTCCCTTT TGCCTTACTA TATGTTCTGT CAGTTTCTTT CAGGAAAATC TTCATCTTAC AACTTGTAGG GCTGGTGTTA ACTTACGACT TCACTAACTG TGACTTTGAG AAGATTAAAG CAGCCTATCT CAGTACTATT TCTAAAGACC TGATTACATA TATGAGTGGG ACCAAAAGTA CCGAGTTCAA CAACACCGTC TCTTGAGCA ATCGGCCACA TTGCCTTACT GAAATCCAGA GCCTAACCTT CAATCCCACC GCCGGCTGCG CGTCGCTCGC CAAAGAAATG TTCGCCATGA AAATAAGGC TGCCTTAGCT ATCTGGTGCC CAGGCTATTC GGAAACTCAG ATAAATGCTA CTCAGGCAAT GAAGAAGAGG AGAAAAAGGA AAGTCACAAC CAATAAATGT CTGGAACAAG TGTCACAATT ACAAGGATTG TGGCGTCGCT TCAATCGACC TTACTGAAA CAACAGTAAA CCATCTTTAT TATGGTCATA TTTCACAGCA CCAAAATAAA TCATCTTTAT TAAGTAGATG AAACATTAAC TCTAACTGTG ACAAAGAAGA CCACAAATAG TTATCTTTTA ATTACAGAAG AGTTTCTTAA CTTACTTTTG TAAGTTTTTA TTGTGTAAGT TTATAATGCA GGGGAAGTAC TACTCCTCAA ATGTTGAGGG AAGCTTCCAT AACATTGATG ACTGGCTTCA TGGCAGTAAT TCTCGGCTGT AGTTGCATAA GCATTGCTCA AGAGGAAAAT CCAAAAGTGC AGCAGGAGAA CTCTTTTCCC TGAAAAAGGA AAAATATTGA ACTCAATGAT AGCACCTAAA CTTACATTTA AAAGACAGAC ATTCTTCTA CATGTAATGA CACTTCTTGT GTAAACTAA AAATTTACAA GAGAAGAAAG TGAAAGCAAA TGGGGTTTCA CAAATAGTTG TAAATATAGT GAAGCAATTT GAAATAATTT TCAAGCAAAG TATTGTGAAA GTATTCTAAG CCAAGTTTTA AATATTATCT AACAGACAAG AGTGGTATAT ACAAGTAGAT CCTGAGAAGT ACCTTTGTGA CAGCTACTAT AAATATACAT ATAAATTATA GAATCTACTT TAATTTATTT TGTGAACACT TTTGAAAATG TACATGTTCC TTTGTAATTG AACTATATA TTTCTTAATA AAATAATTCT CAAATTTGTT TCTTATGAAT CATCTCTCAA ATCTAGTTAG ACAATTTGCA CACATACTTT TCTAAGGGAC ATTATCTTCC TTCAGGTTTT TACCTCCACT CATCCTTAGA GCCCACTGAC TGCTCCCCTT TATACCTGTT GGCCCTGCCT ATAGGAGAGA ATATTTGGAG ATAGGCAGCT TCAGGATGCA TTGCAATCAT CCTTTTCTTA AATTATGTCA CTAGTCTTTT ATTTTTTCCC CTCTTGAAC TCCCTCACAC CTGGAAGAAA CAAAGTAGGA AAAAGTGAAC AGGGGATGTC AAATCGATT TGAATTCCC GCTGCAAGCT AGAGCCGCAG GCACCTCTC
--	--	--	--

			ACTCAATTTTC CACTCAGAAC CCTATAAACA CCAGTGGGAA GGGCAACCCA CTGCACGTGG GAATGCACTG ATTTTTCCTA GGAGTAGACA TGTTCTCTA ATTACTCCCT GAGGGTTAGT TGGGGCTAAA CCATGACAGA AGTGGGGAAG TTCAATGTCC TTAAATCCAT CTTACTTGCC AACAGGTAAG AGGAAGCTTA CATTACATGT CCAGTCCACA TTAAAGAGC ACTTACTGTG GAACAAGCCT TCAGCCAAAC AATGGGGATA GAAAAGTAGG TAAGACTCAG CCTTTGTCCA GAGAAGCTCA GGGTATAGCT GAATAGGCAG TTTCTTTTGT CCTGAGGAAA ATCAGGACAT GCCTGCTTTC TAAAAATCTT CCTCTGAAGA CCTGACCCAA GCTCTTAAAT GCTATTGTAA GAGAAATTTT TTTGTCTATT AACTCCATTT TAGTAGGGAT TCACTGACTA GATTTACTG AACTATGAAA ATAAATACAC ATAATTTTTC ACAAAATTTT GGGCCCAATT CCCCTAAAAG AATTGAGGAT TAGGGAGAAA GGAGACAAC CAAAGTCATC CCATTAAGTG CAGTTTCTTT GAATCTTCTG CTTTATCTTT AAAAATTTGT ATAATTTATA TATTTTATTC TATGTGTTCC ATAGATATCT TAATGTAAAA TTAGTCATTT AAATTACACT GTCAATTAAA AGTAATGGGC AAGAGATTGC ATCATACTAA TTTAGTAAGA ACGTTCCCAA ATGTTGTAAC AATGTGGATC ATACATCTCT GGTTTTTTAA ATGTATTGAG GCTTTCTTGG TGGACTAGTA TAGTATACGG TCAGTTATGT CAATGTTTCA TGGTCAATAA AAAGGAAGTT GCAAATTGT (SEQ ID NO: 28)
智人	TSLP 亚型2 氨基酸	NP_61256 1.2	MFAMKTKAALAIWCPGYSETQINATQAMKKRR KRKVTTNKCLEQVSQLQGLWRRFNRPLLKQQ (SEQ ID NO: 29)

智人	TSLP 亚 型 2 mRNA	NM_1385 51.4	ACCCTCGCCA CGCCCCTGCT CCCCCGCGGT TGGTTCTTCC TTGCTCTACT CAACCTGAC CTCTTCTCTC TGA CTCTCGA CTTGTGTTCC CCGCTCCTCC CTGACCTTCC TCCCCTCCCC TTCACTCAA TTCTCACCAA CTCTTTCTCT CTCTGGTGTT TTCTCCTTTT CTCGTAAACT TTGCCGCCTA TGAGCAGCCA CATTGCCTTA CTGAAATCCA GAGCCTAACC TTCAATCCCA CCGCCGGCTG CGCGTCGCTC GCCAAAGAAA TGTTTCGCCAT GAAAATAAG GCTGCCTTAG CTATCTGGTG CCCAGGCTAT TCGGAAACTC AGATAAATGC TACTCAGGCA ATGAAGAAGA GGAGAAAAAG GAAAGTCACA ACCAATAAAT GTCTGGAACA AGTGTCACAA TTACAAGGAT TGTGGCGTCG CTTCAATCGA CTTTACTGA AACAAACAGTA AACCATCTTT ATTATGGTCA TATTTACAG CACCAAAATA AATCATCTTT ATTAAGTAGA TGAAACATTA ACTCTAACTG TGACAAAGAA GACCACAAAT AGTTATCTTT TAATTACAGA AGAGTTTCTT AACTTACTTT TGTAAGTTTT TATTGTGTAA GTTTATAATG CAGGGGAAGT ACTACTCCTC AAATGTTGAG GGAAGCTTCC ATAACATTGA TGACTGGCTT CATGGCAGTA ATTCTCGGCT GTAGTTGCAT AAGCATTGCT CAAGAGGAAA ATCCAAAAGT GCAGCAGGAG AACTCTTTTC CCTGAAAAAG GAAAAATATT GAACTCAATG ATAGCACCTA AACTTACATT TAAAAGACAG ACATTCCTTC TACATGTAAT GACACTTCTT GTGTTAACT AAAAATTTAC AAGAGAAGAA AGTGAAAGCA AATGGGGTTT CACAAATAGT TGTAATATA GTGAAGCAAT TTGAAATAAT TTTCAAGCAA AGTATTGTGA AAGTATTCTA AGCCAAGTTT
----	-----------------------	-----------------	--

		TAAATATTAT CTAACAGACA AGAGTGGTAT ATACAAGTAG ATCCTGAGAA GTACCTTTGT TACAGCTACT ATAAATATAC ATATAAATTA TAGAATCTAC TTAAATTTAT TTTGTGAACA CTTTTGAAAA TGTACATGTT CCTTTGTAAT TGACACTATA TATTTCTTAA TAAAATAATT CTCAAATTTG TTTCTTATGA ATCATCTCTC AAATCTAGTT AGACAATTTG CACACATACT TTTCTAAGGG ACATTATCTT CCTTCAGGTT TTTACCTCCA CTCATCCTTA GAGCCCACTG ACTGCTCCCC TTTATACCTG TTGGCCCTGC CTATAGGAGA GAATATTTGG AGATAGGCAG CTTCAGGATG CATTGCAATC ATCCTTTTCT TAAATTATGT CACTAGTCTT TTATTTTTTC CCCTCTTGAA CTTTCCTCAC ACCTGGAAGA AACAAAGTAG GAAAAAGTGA ACAGGGGATG TCAAATCGAT TCTTGAATTC CCGCTGCAAG CTAGAGCCGC AGGCACCCTC TCACTCAATT TCCACTCAGA ACCCTATAAA CACCAGTGGG AAGGGCAACC CACTGCACGT GGGAATGCAC TGATTTTTCC TAGGAGTAGA CATGTTCTCT TAATTACTCC CTGAGGGTTA GTTGGGGCTA AACCATGACA GAAGTGGGGA AGTTCAATGT CCTTAAATCC ATCTTACTTG CCAACAGGTA AGAGGAAGCT TACATTACAT GTCCAGTCCA CATTTAAAGA GCACTTACTG TGGAACAAGC CTTCAGCCAA ACAATGGGGA TAGAAAAGTA GGTAAGACTC AGCCTTTGTC CAGAGAAGCT CAGGGTATAG CTGAATAGGC AGTTTCTTTT GTCCTGAGGA AAATCAGGAC ATGCCTGCTT TCTAAAAATC TTCCTCTGAA GACCTGACCC AAGCTCTTAA ATGCTATTGT AAGAGAAATT TCTTTGTCTA TTAACCTCAT TTTAGTAGGG ATTCACTGAC TAGATTTTAC TGAACATGA AAATAAATAC ACATAATTTT TCACAAAATT TTGGGGCCCA TTCCCCTAAA AGAATTGAGG ATTAGGGAGA AAGGAGACAA CTCAAAGTCA TCCCATTAAG TGCAGTTTCT TTGAATCTTC TGCTTTATCT TTAATAATTT GTATAATTTA TATATTTTAT TCTATGTGTT CCATAGATAT CTTAATGTAA AATTAGTCAT TTAAATTACA CTGTCAATTA AAAGTAATGG GCAAGAGATT GCATCATACT AATTTAGTAA GAACGTTCCC AAATGTTGTA ACAATGTGGA TCATACATCT CTGGTTTTTT AAATGTATTG AGGCTTTCTT GGTGGACTAG TATAGTATAC GGTCAAGTTAT GTCAATGTTT CATGGTCAAT AAAAAGGAAG TTGCAAATTG T (SEQ ID NO: 30)
--	--	---

食蟹猴 (Cyno molgus monke y)	TSLP 氨基酸		YDFTNCDFEKIEADYLRTISKDLITYMSGTKSTD FNNTVSCSNRPHCLTEIQSLTFNPTPRCASLAKE MFARKTKATLALWCPGYSETQINATQAMKKRR KRKVTTNKCLEQVSQLLGLWRRFIRTLKKQ (SEQ ID NO: 31)
食蟹猴	TSLP mRNA		TACGACTTCACCAACTGCGACTTCGAGAAGAT CGAGGCCGACTACCTGAGAACCATCAGCAAG GACCTGATCACCTACATGAGCGGCACCAAGA GCACCGACTTCAACAACACCGTGTCTGCAGC AACAGACCCCACTGCCTGACCGAGATCCAGA GCCTGACCTTCAACCCCAACCCCAAGATGTGCC AGCCTGGCCAAAGAGATGTTCGCCAGAAAGA CCAAGGCCACCCTGGCCCTGTGGTGTCCCGGC TACAGCGAGACACAGATCAACGCCACACAGG CCATGAAGAAGCGGCGGAAGCGGAAAGTGAC CACCAACAAGTGCCTGGAACAGGTGTCACAG CTGCTGGGGCTGTGGCGGCGGTTTCATCCGGAC CCTGCTGAAGAAGCAG (SEQ ID NO: 32)
小 鼠 (Mus muscul us)	TSLP 亚 型 1 氨基酸	NP_06734 2.1	MVLLRSLFILQVLVRMGLTYNFSNCNFTSITKIY CNIIFHDLTGDLKGAKFEQIEDCESKPACLLKIEY YTLNPIPGCPSLPDKTFARRTREALNDHCPGYPE TERNDGTQEMAQEVQNICLNQTSQILRLWYSF MQSPE (SEQ ID NO: 33)
小鼠	TSLP 亚 型 1 mRNA	NM_0213 67.2	CACGTTTCAGG CGACAGCATG GTTCTTCTCA GGAGCCTCTT CATCCTGCAA GTACTAGTAC GGATGGGGCT AACTTACAAC TTTTCTAACT GCAACTTCAC GTCAATTACG AAAATATATT GTAACATAAT TTTTCATGAC CTGACTGGAG ATTTGAAAGG GGCTAAGTTC GAGCAAATCG AGGACTGTGA GAGCAAGCCA GCTTGTCTCC TGAAAATCGA GTACTATACT CTCAATCCTA TCCCTGGCTG CCCTTCACTC CCCGACAAAA CATTTGCCCC GAGAACAAGA GAAGCCCTCA ATGACCACTG CCCAGGCTAC CCTGAAACTG AGAGAAATGA CGGTACTCAG GAAATGGCAC AAGAAGTCCA AAACATCTGC CTGAATCAAA CCTCAAAAT TCTAAGATTG TGGTATTCTT TCATGCAATC TCCAGAATAA AATTAGCTTT CAGCTTCTGC TATGAAAATC TCTATCTTGG TTTTAGTGGA CAGAATACTA AGGGTGTGAC ACTTAGAGGA CCACTGGTGT TTATTCTTTA ATTACAGAAG GGATTCTTAA CTTATTTTTT GGCATATCGC TTTTTCAGT ATAGGTGCTT TAAATGGGAA ATGAGCAATA GACCGTTAAT GGAAATATCT GTACTGTAA TGACCAGCTT CTGAGAAAGTC TTTCTCACCT CCCCTGCACA CACCTTACTC TAGGGCAAAC CTAAGTGTAG TAGGAAGAGA ATTGAAAGTA GAAAAAAAAA

			ATTAAAACCA ATGACAGCAT CTAAACCCTG TTAAAAAGGC AAGGATTTTT CTACCTGTAA TGATTCTTCT AACATTCCTA TGCTAAGATT TTACCAAAGA AGAAAATGAC AGTTCGGGCA GTCAGTCCCA TGATGAGGTG GTCTGAAAGA AGATTGTGGA ATCTGGGAGA AACTGCTGAG ATCATATTGC AAATCCAGCT GTCAAAGGGT TCAGACCCAG GACAGTACAA TTCGTGAGCA GATCTCAAGA GCCTTGCACA TCTACGAGAT ATATATTTAA AGTTGTAGAT AATGAATTTT TAATTTATTT TGTGAGCACT TTTGGAAATA TACATGCTAC TTTGTAATGA ATACATTTCT GAATAAAGTA ATTCTCAAGT TTGAAAAAAA AAA (SEQ ID NO: 34)
小鼠	TSLP 亚型 2 mRNA	NR_03320 6.1	ACTCTTGCCA GGCACCTCCC TCCTGTGGGT TGATTCCGTT TTCCTCTTCT CAACTGACTC TGGATTCTGA TACCAGACAC CTTCCTGGTG TCTTTCCCTC CTATCCCCAT CCCCTTCCCT GTCCCTTTCA TTCAATTTTT AATATCTGGC GGGTTTTTTT TTTTTTTTCT CTCTCTCTGA ACTGTGCCGC TTGTGAGCAG CCAGCTTGTC TCCTGAAAAT CGAGTACTAT ACTCTCAATC CTATCCCTGG CTGCCCTTCA CTCCCCGACA AAACATTTGC CCGGAGAACA AGAGAAGCCC TCAATGACCA CTGCCCAGGC TACCCTGAAA CTGAGAGAAA TGACGGTACT CAGGAAATGG CACAAGAAGT CCAAAACATC TGCCTGAATC AAACCTCACA AATTCTAAGA TTGTGGTATT CCTTCATGCA ATCTCCAGAA TAAAATTAGC TTCAGCTTC TGCTATGAAA ATCTCTATCT TGGTTTTAGT GGACAGAATA CTAAGGGTGT GACACTTAGA GGACCACTGG TGTTTATTCT TTAATTACAG AAGGGATTCT TAACTTATTT TTTGGCATAT CGCTTTTTTTC AGTATAGGTG CTTTAAATGG GAAATGAGCA ATAGACCGTT AATGGAAATA TCTGTACTGT TAATGACCAG CTTCTGAGAA GTCTTTCTCA CCTCCCCTGC ACACACCTTA CTCTAGGGCA AACCTAACTG TAGTAGGAAG AGAATTGAAA GTAGAAAAAA AAAATTAAAA CCAATGACAG CATCTAAACC CTGTTTAAAA GGCAAGGATT TTTCTACCTG TAATGATTCT TCTAACATTC CTATGCTAAG ATTTTACCAA AGAAGAAAAT GACAGTTCGG GCAGTCACTG CCATGATGAG GTGGTCTGAA AGAAGATTGT GGAATCTGGG AGAAACTGCT GAGATCATAT TGCAAATCCA GCTGTCAAAG GGTTCAGACC CAGGACAGTA CAATTCGTGA GCAGATCTCA AGAGCCTTGC ACATCTACGA GATATATATT TAAAGTTGTA GATAATGAAT TTCTAATTTA TTTTGTGAGC ACTTTTGAA ATATACATGC TACTTTGTAA TGAATACATT TCTGAATAAA GTAATTCTCA AGTTTGAAAA AAAAAA (SEQ ID NO: 35)

大 鼠 (Rattus norvegi cus)	TSLP 氨基酸	XP_00877 0274.1	MVLFRLYLFIQVVRALTYNFSNCFEMILRIYH ATIFRDLLKDLNGILFDOIEDCDSRTACLLKIDH HTFNPVPGCPSLPEKAFALKTKAALINYPGY SETERNGTLEMTREIRNICLNQTSQILGLWLSICIQ S (SEQ ID NO: 36)
大鼠	TSLP mRNA	XM_0087 72052.1	TCAGGCAACA GCATGGTTCT TTTCAGGTAC CTCTTTATCC TGCAAGTGGT ACGGCTGGCA CTAACTTACA ACTTTTCTAA CTGTAACCTC GAGATGATTT TGAGAATATA TCATGCAACA ATTTTTCGTG ACCTGCTTAA AGATTTGAAT GGGATCTTGT TCGACCAAAT CGAGGACTGT GACAGCAGGA CAGCTTGTCT CCTGAAAATC GACCACCATA CCTTCAATCC TGTCCTTGGC TGCCCGTCAC TCCCGAGAA AGCGTTCGCT TTGAAAACGA AAGCGGCCCT CATTAACCTAC TGCCAGGCT ACTCTGAAAC TGAGAGAAAT GGTACTCTGG AAATGACACG AGAAATCAGA AACATCTGCC TGAATCAAAC CTCACAAATT CTAGGATTGT GGCTTTCCTG CATTCAATCT TGAAGAAAAA ATTAGCTTTT GGATTATATT ATGAAAATAT ATATCTTGTT TTTAGTAGAT ATAATACTAA GGGTGTGACA CTTAAAAGAA CACTAATGTT TATTCTTTAA TTATAGAAGG GATTCTTAAC TTATTTTGG CATATCGTTG TTTAGTGTAG GCGCTTTAAA TGGAAAATGA GCATTACCCC TTAAATGGAA ATAACCGTGC TGTTAATGAT TGGCTTCGGC TTCTGAGCAG TCTTTCTCAC CTCACCTGAG AACTTTTACT CTAGGGCAAA CCTAACTGTA GTAGGAAGAA AATCAAAAGT AGAAAAACAG TTGAAACCAA TGACAGGATC TATACTCCAT TTAAAAGGCA AGAATTTTGT TACCTGTAAT GATTCTTCTA ACATTCTTAC GCTAAGATTT TACTAAAGAA GAAAATAACA GCAGAGGAAA GTGTTTCAGGC AGTCACTGCC ATGATGAAGC TGTCAGAATC TGAGAGCTAC TGCTGCAACT GATCGTGTAG TAAATCCAGC TGTAAGGGG ATCTTAACCC ACCACAGTGG GATGCACAGG CAGATCCCCA AGGGCATTGT GCAGCTGTGA GATATATATT TAAAGTTGTA TATAATGATT TTCTAATTTA TTCCGTGAGC ACCTTTGAAA ATATACATGT CGCTGTGTAA CAAATACACT TCTGAATAAA GTAATTCTCA AGTTC (SEQ ID NO: 37)

[0040] 较长TSLP亚型1与气道炎性疾病的出现有关(Headley等人,2009,Journal of immunology 182,1641-1647;Ying等人,2005,Journal of immunology 174,8183-8190)。如本文所用,术语“TSLP”指TSLP亚型1。如本文所用,人TSLP蛋白质还涵盖在其全长上与GenBank登录编号NP_149024.1的氨基酸序列具有至少约70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的蛋白质。人TSLP核酸序列在其全长上与GenBank登录编号NM_033035.4的核酸序列具有至少约70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%

序列同一性。鼠、食蟹猴 (cyno) 及其他动物 TSLP 蛋白质的序列为本领域中已知的 (参见例如表1)。

[0041] 如本文所用,术语“抗体”指来源于特异性结合于抗原的免疫球蛋白分子的蛋白质或多肽序列。抗体可为多克隆或单克隆、多链或单链或完整免疫球蛋白,可来源于天然来源或重组来源。天然存在的“抗体”为包含通过二硫键相互连接的至少两条重 (H) 链及两条轻 (L) 链的糖蛋白。各重链由重链可变区 (在本文中缩写为 VH) 及重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域 (CH1、CH2 及 CH3) 构成。各轻链由轻链可变区 (本文中缩写为 VL) 及轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域 (CL) 构成。VH 及 VL 区可进一步细分成称为互补决定区 (CDR) 的高变区,分散在称为框架区 (FR) 的较保守区中。各 VH 及 VL 由自氨基端至羧基端按以下顺序排列的三个 CDR 及四个 FR 组成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链及轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子 (包括免疫系统的各种细胞 (例如效应细胞) 及经典补体系统的第一组分 (C1q)) 的结合。抗体可为单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、骆驼化抗体或嵌合抗体。抗体可具有任何同种型 (例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 及 IgY)、类别 (例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2) 或子类。

[0042] 如本文所用,术语抗体的“抗体片段”、“抗原结合片段”、“其抗原结合片段”、“抗原结合部分”及其类似物指保留特异性结合于给定抗原 (例如 TSLP) 的能力的完整抗体的一个或多个片段。抗体的抗原结合功能可由完整抗体的片段执行。术语抗体的“抗原结合部分”内所涵盖的结合片段的实例包括 Fab 片段,一种由 VL、VH、CL 及 CH1 结构域组成的单价片段;F(ab)₂ 片段,一种包含在铰链区通过二硫键桥连接的两个 Fab 片段的二价片段;由 VH 及 CH1 结构域组成的 Fd 片段;由抗体单臂的 VL 及 VH 结构域组成的 Fv 片段;单结构域抗体 (dAb) 片段 (Ward 等人,1989 Nature 341:544-546),其由 VH 结构域组成;及分离的互补决定区 (CDR)。此外,尽管 Fv 片段的两个结构域 (VL 及 VH) 通过独立基因编码,然而其可使用重组方法通过人工肽接头连接,该接头能够使其制备成 VL 及 VH 区成对以形成单价分子的单蛋白链 (称为单链 Fv (scFv));参见,例如 Bird 等人,1988 Science 242:423-426;及 Huston 等人,1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883)。此类单链抗体包括抗体的一个或多个“抗原结合部分”。这些抗体片段使用本领域技术人员已知的现有技术获得,且以与完整抗体相同的方式来筛选供使用的片段。抗原结合部分还可并入单结构域抗体、最大抗体、微型抗体、胞内抗体、双抗体、三抗体、四抗体、v-NAR 及双-scFv 中 (参见例如 Hollinger 及 Hudson, 2005, Nature Biotechnology, 23, 9, 1126-1136)。抗体的抗原结合部分可接枝至基于诸如 III 型纤连蛋白 (Fn3) 的多肽的支架中 (参见美国专利第 6,703,199 号,其描述纤连蛋白多肽单抗体)。抗原结合部分可并入包含一对串联 Fv 区段 (VH-CH1-VH-CH1) 的单链分子中,所述 Fv 区段连同互补轻链多肽形成一对抗原结合区 (Zapata 等人,1995 Protein Eng. 8(10):1057-1062;及美国专利第 5,641,870 号)。

[0043] 术语“表位”包括能够特异性结合于免疫球蛋白或者以其他方式与分子相互作用的任何蛋白质决定簇。表位决定簇一般由诸如氨基酸或碳水化合物或糖侧链的分子的化学活性表面基团组成,且可具有特定三维结构特征,以及特定的电荷特征。表位可为“线性”或“构象”。构象表位与线性表位的区别在于,在变性溶剂存在下,与前者的结合消失,但与后者的结合未消失。

[0044] 术语“互补位”的定义通过将视角逆转而来源于以上“表位”的定义。因此,如本文所用,术语“互补位”指抗体或抗体片段上抗原特异性结合(即,使得抗体或抗体片段与抗原物理接触)的区域或区。

[0045] 在通过抗体(例如Fab片段)与其抗原之间复合物的空间坐标定义的X射线衍生的晶体结构的情形下,除非另外规定或上下文矛盾,否则术语互补位在本文中具体定义为特征在于与目标抗原中的重原子在规定距离内(例如在4埃距离内)具有重原子(即非氢原子)的抗体残基。

[0046] 如本文所用,术语“互补决定区”及“CDR”指负责抗原结合的抗体或抗原结合片段的氨基酸残基。

[0047] 如本文所用,术语“单价抗体”指结合于目标分子上的单个表位的抗体。

[0048] 如本文所用,术语“二价抗体”指结合于至少两个相同目标分子上的两个表位的抗体。二价抗体还可使目标分子彼此交联。“二价抗体”还指结合于至少两个相同目标分子上的两个不同表位的抗体。

[0049] 术语“多价抗体”指价数大于一的单个结合分子,其中“价数”描述为每分子抗体构建体所存在的抗原结合部分的数目。因此,单个结合分子可结合于目标分子上的大于一个结合位点。多价抗体的实例包括(但不限于)二价抗体、三价抗体、四价抗体、五价抗体及其类似物,以及双特异性抗体及双互补位抗体。举例而言,对于TSLP,诸如TSLP双互补位抗体的多价抗体将具有分别识别TSLP的两个不同结构域的结合部分。

[0050] 术语“多价抗体”还指对两个单独目标分子具有大于一个抗原结合部分的单个结合分子。举例而言,结合于TSLP及并非TSLP的第二目标分子的抗体。在一个实施方案中,多价抗体为具有四个表位结合结构域的四价抗体。四价分子可为双特异性且对目标分子上的每个结合位点呈二价。

[0051] 如本文所用,术语“双互补位抗体”指结合于单个目标分子上的两个不同表位的抗体。该术语还包括结合于至少两个目标分子的两个结构域的抗体,例如四价双互补位抗体。

[0052] 如本文所用,术语“双特异性抗体”指结合于至少两个不同目标上的两个或大于两个不同表位的抗体。

[0053] 如本文所用,词组“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”指具有基本上一致的氨基酸序列或来源于同一遗传来源的多肽,包括抗体、双特异性抗体等。此术语还包括单个分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物展示对特定表位的单个结合特异性及亲和力。

[0054] 如本文所用,词组“人抗体”包括可变区的框架区及CDR区均来源于人源序列的抗体。此外,若抗体含有恒定区,则恒定区还来源于此类人序列,例如人胚系序列,或人胚系序列或抗体的突变型,其含有来源于人框架序列分析的共同框架序列,例如如Knappik等人(2000.J Mol Biol 296,57-86)中所述。免疫球蛋白可变结构域(例如CDR)的结构及位置可使用熟知编号方案定义,例如Kabat编号方案、Chothia编号方案或Kabat及Chothia的组合(参见例如Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Department of Health and Human Services(1991),Kabat等人编;Al Lazikani等人,(1997) J.Mol.Bio.273:927-948);Kabat等人,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,NIH公开号91-3242U.S.Department of Health and Human Services;Chothia等人,(1987) J.Mol.Biol.196:901-917;Chothia等人,(1989) Nature 342:877-

883;及Al-Lazikani等人,(1997) J.Mol.Biol.273:927-948。

[0055] 本发明的人抗体可包括并非由人序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或定点诱变或通过体内体细胞突变引入的突变,或有助于稳定性或制备的保守性取代)。然而,如本文所用,术语“人抗体”并不意欲包括来源于另一哺乳动物物种(诸如小鼠)的胚系已接枝于人框架序列上的CDR序列的抗体。

[0056] 如本文所用,词组“重组人抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,诸如自人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体动物(例如小鼠)或自其制备的杂交瘤中分离的抗体;自经转化以表达人抗体的宿主细胞(例如转染瘤)中分离的抗体;自重组、组合人抗体文库中分离的抗体;及通过任何其他方式(包括将人免疫球蛋白基因序列的全部或一部分与其他DNA序列拼接)制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有框架区及CDR区来源于人胚系免疫球蛋白序列的可变区。然而,在某些实施方案中,此类重组人抗体可进行体外诱变(或当使用人Ig序列的转基因动物时,为体内体细胞诱变),且因此重组抗体的VH及VL区的氨基酸序列为这样的序列:虽然来源于人胚系VH及VL序列且与其相关,但体内可不天然存在于人抗体胚系谱系内。

[0057] 如本文所用,术语“Fc区”指包含抗体恒定结构域的CH3、CH2及铰链区的至少一部分的多肽。可选地,Fc区可包括存在于一些抗体类别中的CH4结构域。Fc区可包含抗体恒定结构域的全部铰链区。在一个实施方案中,本发明包含抗体的Fc区及CH1区。在一个实施方案中,本发明包含抗体的Fc区CH3区。在另一实施方案中,本发明包含抗体恒定结构域的Fc区、CH1区及C κ / λ 区。在一个实施方案中,本发明的结合分子包含恒定区,例如重链恒定区。在一个实施方案中,此类恒定区与野生型恒定区相比经修饰。即,本文所揭示的本发明的多肽可包含对三个重链恒定结构域(CH1、CH2或CH3)和/或轻链恒定区结构域(CL)中的一个或多个的更改或修饰。修饰实例包括一个或多个结构域中的一个或多个氨基酸的添加、缺失或取代。可包括此类变化以使效应功能、半衰期等优化。

[0058] 如本文所用,术语“亲和力”指在单个抗原位点处抗体与抗原之间相互作用的强度。在各抗原位点内,抗体“臂”的可变区通过弱非共价力与抗原在多个位点处相互作用;相互作用越大,亲和力愈强。如本文所用,对于IgG抗体或其片段(例如Fab片段),术语“高亲和力”指抗体对于目标抗原具有 10^{-8} M或小于 10^{-8} M、 10^{-9} M或小于 10^{-9} M、或 10^{-10} M、或 10^{-11} M或小于 10^{-11} M、或 10^{-12} M或小于 10^{-12} M、或 10^{-13} M或小于 10^{-13} M的分解力(knock down)。然而,对于其他抗体同种型,高亲和力结合可变化。举例而言,对于IgM同种型,高亲和力结合指抗体具有 10^{-7} M或小于 10^{-7} M、或 10^{-8} M或小于 10^{-8} M的分解力。

[0059] 如本文所用,术语“亲合力”指抗体-抗原复合物的整体稳定性或强度的信息性量度。其由三个主要因素控制:抗体表位亲和力;抗原与抗体两者的价数;以及相互作用部分的结构配置。最终,这些因素确定抗体的特异性,即特定抗体结合于精确抗原的表位的可能性。

[0060] 如本文所用,术语“结合特异性”指个别抗体组合位点与一种抗原决定簇反应且不与不同抗原决定簇反应的能力。抗体的组合位点位于分子的Fab部分且由重链及轻链的高变区构建。抗体的结合亲和力为单个抗原决定簇与抗体上单个组合位点之间的反应强度。其为抗原决定簇与抗体组合位点之间作用的引力及斥力总和。

[0061] 术语“治疗(treat/treatment)”指治疗性治疗及预防性或防治性措施,其中受试

者为预防或减缓不当生理变化或病症。出于本发明的目的,有益或所需临床结果包括(但不限于)症状缓解、疾病程度减轻、疾病状态稳定(即不恶化)、疾病进程延迟或减缓、疾病状态改善或缓和以及缓解(部分或完全),无论可检测或不可检测。“治疗”还可意指相比于不接受治疗的预期存活期,存活期延长。

[0062] 术语“受试者”指向其提供根据本发明方法的治疗的动物、人或非人。涵盖兽医学及非兽医学应用。该术语包括(但不限于)哺乳动物,例如人、其他灵长类、猪、啮齿动物(诸如小鼠及大鼠、兔、豚鼠、仓鼠)、牛、马、猫、狗、绵羊及山羊。典型受试者包括人、农畜及家养宠物(诸如猫及狗)。

[0063] “有效量”指足以实现有益或所需结果的量。举例而言,治疗量为实现所需治疗作用的量。此量可与预防有效量相同或不同,预防有效量为预防疾病或疾病症状发作所需要的量。有效量可以一次或多次施用、应用或剂量施用。治疗性化合物的“治疗有效量”(即有效剂量)根据所选治疗性化合物而定。例如可每天一次或多次至每周一次或多次、至每月一次或多次、至每年一次或多次施用组合物。本领域技术人员应了解,某些因素可影响有效治疗受试者所需的剂量及时间安排,包括(但不限于)疾病或疾患的严重程度、先前治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄及存在的其他疾病。此外,用治疗有效量的本文所述的治疗性化合物治疗受试者可包括单个治疗或一系列治疗。

[0064] 术语“核酸”或“多核苷酸”指呈单链或双链形式的脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非明确限制,否则该术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,所述已知类似物具有与参考核酸类似的结合特性且以与天然存在的核苷酸类似的方式代谢。除非另外指明,否则特定核酸序列还隐含地涵盖其经保守修饰的变体(例如简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP及互补序列以及明确指明的序列。特定言之,简并密码子取代可通过产生一个或多个所选(或所有)密码子的第三位置经混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来实现(Batzer等人,Nucleic Acid Res.19:5081(1991);Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985);及Rossolini等人,Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994))。

[0065] 术语“肽”、“多肽”及“蛋白质”可互换使用,且指包含由肽键共价连接的氨基酸残基的化合物。蛋白质或肽必须含有至少两个氨基酸,且对可包含蛋白质或肽序列的氨基酸的最大数目无限制。多肽包括任何包含通过肽键彼此连接的两个或大于两个氨基酸的肽或蛋白质。如本文所用,该术语指短链(其在本领域中通常还称为例如肽、寡肽及寡聚物)及长链(其在本领域中一般称为蛋白质,其存在多种类型)。“多肽”尤其包括例如生物活性片段、基本上同源多肽、寡肽、同二聚体、异二聚体、多肽变体、经修饰多肽、衍生物、类似物、融合蛋白。多肽包括天然肽、重组肽或其组合。

[0066] 术语“保守序列修饰”指不显著影响或改变含有该氨基酸序列的抗体或抗体片段的结合特征的氨基酸修饰。此类保守修饰包括氨基酸取代、添加及缺失。修饰可通过本领域中已知的标准技术(诸如定点诱变及PCR介导的诱变)引入本发明的抗体或抗体片段中。保守氨基酸取代为氨基酸残基经具有类似侧链的氨基酸残基置换的取代。本领域中已定义具有类似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、

异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β 支链侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)及芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,本发明的分子(诸如抗体或抗体片段)内的一个或多个氨基酸残基可经来自相同侧链家族的其他氨基酸残基置换,且经改变的分子可使用本文所述的功能性分析加以测试。

[0067] 术语“同源”或“同一性”指在两个聚合分子之间,例如在诸如两个DNA分子或两个RNA分子的两个核酸分子之间,或在两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当两个分子中的亚基位置由相同单体亚基占据时;例如若两个DNA分子中的每一者中的位置均由腺嘌呤占据,则其在该位置处为同源或一致的。两个序列之间的同源性为匹配或同源位置数目的直接函数;例如若两个序列中的位置有一半(例如,长度为十个亚基的聚合物中的五个位置)同源,则两个序列为50%同源;若90%的位置(例如,10个中的9个)匹配或同源,则两个序列为90%同源。“序列同一性”的百分比可通过在比较窗口比较两个经最佳比对的序列来确定,其中为了两个序列最佳比对,比较窗口中的氨基酸序列的片段与参考序列(其不包含添加或缺失)相比,可包含添加或缺失(例如空位或悬垂)。该百分比可如下计算:测定两个序列中存在的一致氨基酸残基的位置数,得到匹配位置数,将匹配位置数除以比较窗中的总位置数并将结果乘以100,得到序列同一性百分比。输出为受试序列相对于查询序列的同一性百分比。

[0068] 术语“经分离”意指自天然状态改变或移除。举例而言,天然存在于活动物中的核酸或肽并非“经分离”,但自其天然状态的共存材料部分或完全分离的相同核酸或肽为“经分离”。经分离核酸或蛋白质可以基本上经纯化的形式存在或可存在于诸如宿主细胞的非原生环境中。经分离抗体基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体(例如,特异性结合TSLP的经分离抗体基本上不含特异性结合除TSLP以外的抗原的抗体)。然而,特异性结合目标分子的经分离抗体可对来自其他物种的相同抗原具有交叉反应性,例如特异性结合人TSLP的经分离抗体可结合来自其他物种的TSLP分子。此外,经分离抗体可基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0069] 在一些实施方案中,本申请的干粉制剂包含核壳颗粒,所述核壳颗粒包含:壳形成赋形剂及包含API、玻璃形成赋形剂及缓冲液的核心,有时在本文中还可称为平台制剂或壳核平台制剂。

[0070] 如本文所用,术语“活性成分”、“治疗活性成分”、“活性剂”、“药物”或“原料药”意指药物的活性成分,还称为活性药物成分(API)。

[0071] 如本文所用,术语“质量中值直径”或“MMD”或“ x_{50} ”意指通常呈多分散颗粒群体形式(即由一系列粒度组成)的多个颗粒的中值直径。除非上下文另外指示,否则如本文所报导的MMD值通过激光衍射(Sympatec Helos, Clausthal-Zellerfeld, Germany)测定。相比之下, d_g 表示单个颗粒的几何直径。

[0072] 如本文所用,术语“敲紧密度(tapped density)”或 $\rho_{\text{敲紧}}$ 指根据如例如www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/m99375-bulk_density_and_tapped_density_of_powders.pdf所述的方法I所测量的颗粒密度。敲紧密度表示最接近的颗粒密度近似值,其中测量值比实际颗粒密度小大约20%。

[0073] 如本文所用,术语“皱”意指具有许多皱折或褶皱,即脊形或起皱。

[0074] 如本文所用,术语“皱度(rugosity)”为经工程改造的颗粒的表面粗糙度的量度。

出于本发明的目的, 皱度由自BET测量获得的比表面积、自氦比重瓶测定法获得的真密度及通过激光衍射 (Sympatec) 获得的表面积与体积比计算所得, 即:

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

其中 $S_v = 6/D_{32}$, 其中 D_{32} 为基于单位表面积的平均直径。预期表面粗糙度的增加减小颗粒间凝聚力且改进气溶胶靶向肺。预期经改进的肺靶向减小患者间变异性及药物在口咽及体循环中的含量。在一个或多个实施方案中, 皱度 S_v 为3至20, 例如5至10。

[0075] 如本文所用, 术语“初始颗粒的中值空气动力学直径”或 D_a 由通过激光衍射测定的颗粒的初始几何尺寸 (x_{50}) 及其敲紧密度计算所得, 即: $D_a = x_{50} (\rho_{\text{敲紧}})^{1/2}$ 。

[0076] 如本文所用, 术语“递送剂量”或“DD”指在粉末单元的致动或分散事件之后, 由吸入器装置递送干粉的示数。DD定义为由吸入器装置递送的剂量与标称或定量剂量的比率。DD为以实验方式测定的参数, 且可使用模拟患者给药的体外装置设定来测定。

[0077] 如本文所用, 术语“质量中值空气动力学直径”或“MMAD”指通常呈多分散群体形式的多个颗粒的中值空气动力学尺寸。“空气动力学直径”为一般在空气中具有与粉末相同的沉降速度的单位密度球体的直径, 因此为在其沉降行为方面表征雾化粉末或其他分散颗粒或颗粒制剂的适用方式。空气动力学粒度分布 (APSD) 及MMAD在本文中通过使用NEXT GENERATION IMPACTOR™的级联碰撞来测定。一般而言, 若颗粒在空气动力学方面太大, 则较少颗粒将到达深肺。若颗粒太小, 则可能呼出较大百分比的颗粒。相比之下, d_a 表示单个颗粒的空气动力学直径。

[0078] 如本文所用, 术语“总肺剂量” (TLD) 指在4kPa压力下下降下自干粉吸入器吸入粉末后未沉积在理想化艾伯塔口-喉模型 (Alberta mouth-throat model) 中的活性成分百分比。数据可表示为标称剂量或递送剂量的百分比。AIT表示普通成年受试者上呼吸道的理想化版本。除非另外陈述, 否则TLD在艾伯塔理想化喉模型中测量。关于AIT的信息及实验设定的详细描述可见于: www.copleyscientific.com。

[0079] 如本文所用, 术语“惯性参数”指表征上呼吸道中的惯性碰撞的参数。该参数由斯托克定律 (Stoke's Law) 推导出且等于 $d_a^2 Q$, 其中 d_a 为空气动力学直径, 且 Q 为体积流率。

[0080] 如本文所用, 术语“固体含量”指溶解或分散于有待喷雾干燥的液体溶液或分散液中的活性成分及赋形剂的浓度。

[0081] 如本文所用, 术语“ALR”为界定雾化器中所用空气与液体比的工艺参数。较小ALR值通常产生较大雾化液滴。

[0082] 如本文所用, 术语“颗粒群体密度” (PPD) 为由固体含量及雾化器液体流率的乘积除以总干燥器气体流率计算所得的无因次数。已观察到PPD与初始几何粒度相关。

TSLP结合分子

[0083] 本文提供特异性结合TSLP且抑制TSLP活性的分子, 例如抗体或抗体片段, 包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv及dAb片段、scFv、单结构域抗体、最大抗体、微型抗体、胞内抗体、双抗体、三抗体、四抗体、v-NAR及双-SCFv。这些分子适用于治疗TSLP相关炎症病症, 包括哮喘及慢性阻塞性肺病。由于TSLP为Th2效应细胞因子上游的关键节点细胞因子, 故抑制TSLP可同时阻断多个下游Th2效应子 (例如IL-4、IL-5、IL-13) 且还可影响非Th2介导的路径 (例如IL-17、IFN- γ)。

TSLP抗体及TSLP结合抗体片段

[0084] 在一些实施方案中,本发明提供特异性结合于人TSLP的抗体及抗体片段。TSLP抗体及抗体片段包括(但不限于)如本文(包括实例中)所述产生的人及人源化单克隆抗体及抗体片段。在一些实施方案中,本发明提供一种经分离抗体或其抗原结合片段,其以小于100pM的解离常数(K_D),例如小于90pM、小于80pM、小于70pM、小于60pM、小于50pM、小于40pM、小于30pM、小于20pM、小于10pM的 K_D 结合人TSLP。在一些实施方案中,本文所提供的经分离抗体或抗原结合片段以小于10pM的解离常数(K_D)结合人TSLP。

[0085] 在一些实施方案中,本文所提供的TSLP结合分子包括重链CDR1、重链CDR2、重链CDR3及轻链CDR1、轻链CDR2及轻链CDR3。在一些实施方案中,本文所提供的TSLP结合分子包括包含CDR1、CDR2及CDR3的重链可变区及包含CDR1、CDR2及CDR3的轻链可变区。在一些实施方案中,本文所提供的TSLP结合分子包括全长重链序列及全长轻链序列。在一些实施方案中,该分子为TSLP结合Fab。

[0086] 表2列出示例性TSLP结合抗体及Fab的序列,其皆以高亲和力结合于人TSLP。举例而言,抗TSLP Fab1以6pM的解离常数(K_D)结合于重组人TSLP。在一些实施方案中,抗TSLP Fab1分别以 5.0 ± 2.0 pM及 1.4 ± 0.6 pM的 K_D 值结合于人及食蟹猴TSLP蛋白质。

表2. 抗TSLP Fab及抗体的氨基酸序列

抗-TSLP mAb1		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (组合)	GFTFSDYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (组合)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (组合)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Kabat)	DYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 5	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
SEQ ID NO: 6	HCDR2 (Chothia)	KSKTDAGT
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Chothia)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 7	VH	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSDY WMHWVRQAPGKGLEWVGHIKSKTDAGTTDY AAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCAREIYYAFDSWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO: 8	VH DNA	GAGGTTTCAGCTGGTGGAATCAGGCGGCGGA CTGGTTAAGCCTGGCGGTAGCCTTAGACTTA GCTGCGCTGCTAGTGGCTTACCTTTAGCGA CTACTGGATGCACTGGGTTAGACAGGCCCT GGTAAAGGCTTGGAGTGGGTCGGACACATTA AGTCTAAGACCGACGCCGGCACTACCGACTA CGCCGCTCCCGTTAAGGGCCGGTTCATATC TCTAGGGACGACTCTAAGAACACCTCTACC TTCAAATGAATAGCCTTAAGACCGAGGACAC CGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAAATCTAC TACTACGCCTTCGATAGCTGGGGTCAAGGCA CCCTCGTGACCGTGTCTAGC
SEQ ID NO: 9	重链	EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTFSDY WMHWVRQAPGKGLEWVGHIKSKTDAGTTDY AAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCAREIYYAFDSWGQGTTLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
SEQ ID NO: 10	重链 DNA	GAGGTTTCAGCTGGTGGAATCAGGCGGCGGA

		CTGGTTAAGCCTGGCGGTAGCCTTAGACTTA GCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTTAGCGA CTACTGGATGCACTGGGTTAGACAGGCCCT GGTAAAGGCTTGGAGTGGGTTCGGACACATTA AGTCTAAGACCGACGCCGGCACTACCGACTA CGCCGCTCCCGTTAAGGGCCGGTTCACTATC TCTAGGGACGACTCTAAGAACACCTCTACC TTCAAATGAATAGCCTTAAGACCGAGGACAC CGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAAATCTAC TACTACGCCTTCGATAGCTGGGGTCAAGGCA CCCTCGTGACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAA GGGCCCCAAGTGTGTTCCCTGGCCCCCAGC AGCAAGTCTACTTCCGGCGGAAGTCTGCCCC TGGGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGA GCCCGTGACAGTGTCTGGAAGTCTGGGGCT CTGACTTCCGGCGTGACACCTTCCCCGCCG TGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAG CAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTG GGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA GAGTGGAGCCCCAAGAGCTGCGACAAGACCC ACACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACT GCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTTCCCCC CCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAG GACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGAC GTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACA ACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGT ACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCT GACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC AAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACAAG GCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCA GCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCC AGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT CTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGATATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCG AGAACAACCTACAAGACCACCCCCCAGTGCT GGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGC AAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGC ACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA GTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (组合)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (组合)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (组合)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Kabat)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Kabat)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Kabat)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 14	LCDR1 (Chothia)	DNIGSKY

SEQ ID NO: 15	LCDR2 (Chothia)	GDN
SEQ ID NO: 16	LCDR3 (Chothia)	ADWVDFY
SEQ ID NO: 17	VL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYVH WYQQKPGQAPVPLVIYGDNERPSGIPERFSGSNS GNTATLTISRAGDEADYYCQAADWVDFYV FGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 18	VL DNA	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTTAGCGTTA GCGTGGCCCTGGGTCAAACCGCTAGAATCAC CTGTAGCGGCGATAATATCGGCTCTAAATAC GTTCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAAG CCCCGTGCTCGTGATCTACGGCGATAACGA GCGGCCTAGCGGAATCCCCGAGCGGTTTAGC GGCTCTAATAGCGGTAACACCGCTACCCTGA CTATCTCTAGGGCTCAGGCCGGCGACGAGGC CGACTACTACTGTCAGGCCGCCGACTGGGTG GACTTCTACGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAGC TGACCGTGCTG
SEQ ID NO: 19	轻链	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYVH WYQQKPGQAPVPLVIYGDNERPSGIPERFSGSNS GNTATLTISRAGDEADYYCQAADWVDFYV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 20	轻链 DNA	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTTAGCGTTA GCGTGGCCCTGGGTCAAACCGCTAGAATCAC CTGTAGCGGCGATAATATCGGCTCTAAATAC GTTCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAAG CCCCGTGCTCGTGATCTACGGCGATAACGA GCGGCCTAGCGGAATCCCCGAGCGGTTTAGC GGCTCTAATAGCGGTAACACCGCTACCCTGA CTATCTCTAGGGCTCAGGCCGGCGACGAGGC CGACTACTACTGTCAGGCCGCCGACTGGGTG GACTTCTACGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAGC TGACCGTGCTGGGTCAACCTAAGGCTGCCCC CAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAG GAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGT GCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGT GACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCC CGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCC AGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCC AGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGT GGAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGT GACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAGAC CGTGGCCCCAACCGAGTGCAGC
抗-TSLP Fab1		
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (组合)	GFTFSDYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (组合)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (组合)	EIYYAFDS

SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Kabat)	DYWMH
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	HIKSKTDAGTTDYAAPVKG
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 5	HCDR1 (Chothia)	GFTFSDY
SEQ ID NO: 6	HCDR2 (Chothia)	KSKTDAGT
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Chothia)	EIYYAFDS
SEQ ID NO: 7	VH	EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSDY WMHWVRQAPGKGLEWVGHIKSKTDAGTTDY AAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCAREIYYAFDSWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO: 21	VH DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCAGGCGGCGGA CTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGA GCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTTAGCGA CTACTGGATGCACTGGGTTCAGACAGGCCCT GGTAAAGGCCTGGAGTGGGTTCGGACACATTA AGTCTAAGACCGACGCCGGCACTACCGACTA CGCCGCTCCTGTGAAGGGCCGGTTCATATC TCTAGGGACGACTCTAAGAACACCCTGTACC TGCAGATGAATAGCCTGAAAACCGAGGACA CCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGATCTA CTACTACGCCTTCGATAGCTGGGGTCAGGGC ACCCTGGTCACCGTGTCTAGC
SEQ ID NO: 22	重链	EVQLVESGGGLVLPKPGGSLRLSCAASGFTFSDY WMHWVRQAPGKGLEWVGHIKSKTDAGTTDY AAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCAREIYYAFDSWGQGLTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC
SEQ ID NO: 23	重链 DNA	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCAGGCGGCGGA CTGGTCAAGCCTGGCGGTAGCCTGAGACTGA GCTGCGCTGCTAGTGGCTTCACCTTTAGCGA CTACTGGATGCACTGGGTTCAGACAGGCCCT GGTAAAGGCCTGGAGTGGGTTCGGACACATTA AGTCTAAGACCGACGCCGGCACTACCGACTA CGCCGCTCCTGTGAAGGGCCGGTTCATATC TCTAGGGACGACTCTAAGAACACCCTGTACC TGCAGATGAATAGCCTGAAAACCGAGGACA CCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGATCTA CTACTACGCCTTCGATAGCTGGGGTCAGGGC ACCCTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTA AGGGCCCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTCC AGCAAGTCTACCTCTGGCGGCACCGCTGCTC TGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGA GCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCC CTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCG TGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCC TCCGTGGTGAAGTGCCTTCCCTCCAGCCTGG GCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCA

		CAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGCG GGTGGAGCCTAAGTCATGC
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (组合)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (组合)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (组合)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Kabat)	SGDNIGSKYVH
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Kabat)	GDNERPS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Kabat)	QAADWVDFYV
SEQ ID NO: 14	LCDR1 (Chothia)	DNIGSKY
SEQ ID NO: 15	LCDR2 (Chothia)	GDN
SEQ ID NO: 16	LCDR3 (Chothia)	ADWVDFY
SEQ ID NO: 17	VL	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYVH WYQQKPGQAPVPLVIYGDNERPSGIPERFSGSNS GNTATLTISRAGDEADYYCQAADWVDFYV FGGGTKLTVL
SEQ ID NO: 24	VL DNA	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTGAGCGTCA GCGTGGCCCTGGGTCAGACCGCTAGAAATCAC CTGTAGCGGCGATAATATCGGCTCTAAATAC GTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAGG CCCCGTGCTGGTGATCTACGGCGATAACGA GCGGCCTAGCGGAATCCCCGAGCGGTTTAGC GGCTCTAATAGCGGTAACACCGCTACCCTGA CTATCTCTAGGGCTCAGGCCGGCGACGAGGC CGACTACTACTGTCAGGCCGCCGACTGGGTG GACTTCTACGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAGC TGACCGTGCTG
SEQ ID NO: 25	轻链	SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYVH WYQQKPGQAPVPLVIYGDNERPSGIPERFSGSNS GNTATLTISRAGDEADYYCQAADWVDFYV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TPPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO: 26	轻链 DNA	AGCTACGAGCTGACTCAGCCCCTGAGCGTCA GCGTGGCCCTGGGTCAGACCGCTAGAAATCAC CTGTAGCGGCGATAATATCGGCTCTAAATAC GTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAGG CCCCGTGCTGGTGATCTACGGCGATAACGA GCGGCCTAGCGGAATCCCCGAGCGGTTTAGC GGCTCTAATAGCGGTAACACCGCTACCCTGA CTATCTCTAGGGCTCAGGCCGGCGACGAGGC CGACTACTACTGTCAGGCCGCCGACTGGGTG GACTTCTACGTGTTTCGGCGGAGGCACTAAGC TGACCGTGCTGGGTCAGCCTAAGGCTGCCCC CAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAG GAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGT GCCTGATCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGT GACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCC CGTGAAGGCCGGCGTGAGACCACCAACCCCC
		AGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCC AGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGT GGAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGT GACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAAGAAC CGTGGCCCCAACCGAGTGCAGC

[0087] 在一些实施方案中,抗体包含具有表2中所列出的VH CDR中的任一者的氨基酸序

列的VH CDR。具体而言,本发明提供特异性结合于TSLP蛋白质的抗体,所述抗体包含一个、两个、三个、四个、五个或六个具有表2中所列出的VH CDR中的任一者的氨基酸序列的VH CDR(或者由其组成)。本发明还提供特异性结合于TSLP蛋白质的抗体,所述抗体包含具有表2中所列出的VL CDR中的任一者的氨基酸序列的VL CDR。具体而言,本发明提供特异性结合于TSLP蛋白质的抗体,所述抗体包含一个、两个、三个、四个、五个或六个具有表2中所列出的VL CDR中的任一者的氨基酸序列的VL CDR(或者由其组成)。

[0088] 本发明还提供包含表2中列出的VH氨基酸序列(或者由其组成)的抗体及其抗原结合片段,其中框架序列(例如不为CDR的序列)中不超过约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸已突变(其中作为各种非限制性实例,突变为添加、取代或缺失)。

[0089] 本发明还提供特异性结合于TSLP的抗体及其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含表2中列出的VL氨基酸序列(或者由其组成),其中框架序列(例如不为CDR的序列)中不超过约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸已突变(其中作为各种非限制性实例,突变为添加、取代或缺失)。

[0090] 本发明的其他抗体及其抗原结合片段包括已突变但在CDR区中仍与表2中所述的序列中所描绘的CDR区具有至少60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%同一性的氨基酸,且能够结合于TSLP。在一个方面,本发明的其他抗体及其抗原结合片段包括突变氨基酸序列,其中当与表2中所述的序列中所描绘的CDR区相比时,CDR区中不超过1、2、3、4或5个氨基酸已突变。

[0091] 本发明还提供编码特异性结合于TSLP蛋白质的抗体及其抗原结合片段的VH、VL、全长重链及全长轻链的核酸序列。此类核酸序列可经优化以在哺乳动物细胞中表达。

[0092] 其他TSLP抗体及其抗原结合片段包括其中氨基酸或编码氨基酸的核酸已突变、但仍与表2中所述的序列具有至少60、70、80、90或95%同一性的TSLP抗体及其抗原结合片段。在一个实施方案中,所述抗体及其抗原结合片段包括突变氨基酸序列,其中当与表2中所述的序列中所描绘的可变区相比时,可变区中不超过1、2、3、4或5个氨基酸已突变,然而仍保留基本上相同的治疗活性。

[0093] 由于本文所揭示的抗体中的每一者可结合于TSLP,故VH、VL、全长轻链及全长重链序列(氨基酸序列及编码氨基酸序列的核苷酸序列)可“经混合及匹配”以形成本发明的其他TSLP结合抗体及其抗原结合片段。此类“经混合及匹配”的TSLP结合抗体可使用本领域中已知的结合分析(例如ELISA及实例部分中所述的其他分析)来测试。当这些链经混合及匹配时,来自特定VH/VL对的VH序列应经结构上类似的VH序列置换。同样,来自特定全长重链/全长轻链对的全长重链序列应经结构上类似的全长重链序列置换。同样,来自特定VH/VL对的VL序列应经结构上类似的VL序列置换。同样,来自特定全长重链/全长轻链对的全长轻链序列应经结构上类似的全长轻链序列置换。

[0094] 在另一方面,本发明提供TSLP结合抗体,其包含如表2中所述的重链及轻链CDR1、CDR2及CDR3或其组合。CDR区使用Kabat系统(Kabat等人1991Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH公开号91-3242)或使用Chothia系统(Chothia等人1987J.Mol.Biol.196:901-917;及Al-Lazikani等人1997J.Mol.Biol.273:927-948)来划定。或者可使用其他划定CDR区的方法。

举例而言, Kabat及Chothia的CDR定义可经组合。

[0095] 鉴于这些抗体中的每一者可结合于TSLP且抗原结合特异性主要由CDR1、2及3区提供, 因此VH CDR1、2及3序列与VL CDR1、2及3序列可“经混合及匹配”(即来自不同抗体的CDR可经混合及匹配, 但各抗体必须含有VH CDR1、2及3以及VL CDR1、2及3以产生本发明的其他TSLP结合结合分子。此类“经混合及匹配”的TSLP结合抗体可使用本领域中已知的结合分析及实例中所述的结合分析(例如ELISA)来测试。当VH CDR序列经混合及匹配时, 来自特定VH序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列应经结构上类似的CDR序列置换。同样, 当VL CDR序列经混合及匹配时, 来自特定VL序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列应经结构上类似的CDR序列置换。一般技术者将显而易见, 新的VH及VL序列可通过用来自本文中针对本发明的单克隆抗体所示的CDR序列的结构上类似的序列使一个或多个VH和/或VL CDR区序列突变来产生。

[0096] 因此, 本发明提供一种经分离单克隆抗体或其抗原结合片段, 其包含具有选自SEQ ID NO:1、4或5中的任一者的氨基酸序列的重链可变区CDR1(HCDR1); 具有选自SEQ ID NO:2或6中的任一者的氨基酸序列的重链可变区CDR2(HCDR2); 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区CDR3(HCDR3); 具有选自SEQ ID NO:11或14中的任一者的氨基酸序列的轻链可变区CDR1(LCDR1); 具有选自SEQ ID NO:12或15中的任一者的氨基酸序列的轻链可变区CDR2(LCDR2); 及具有选自SEQ ID NO:13或16中的任一者的氨基酸序列的轻链可变区CDR3(LCDR3); 其中该抗体或抗体片段特异性结合TSLP。

[0097] 在一些实施方案中, 特异性结合于TSLP的抗体或抗体片段为表2中所述的抗体或抗体片段。

[0098] 在一些实施方案中, 本发明提供一种经分离抗体或其抗原结合片段, 其结合人TSLP且包含分别为SEQ ID NO:4、2及3的HCDR1、HCDR2及HCDR3序列, 及分别为SEQ ID NO:11、12及13的LCDR1、LCDR2及LCDR3序列。

[0099] 在一些实施方案中, 本发明提供一种经分离抗体或其抗原结合片段, 其结合人TSLP且包含分别为SEQ ID NO:5、6及3的HCDR1、HCDR2及HCDR3序列, 及分别为SEQ ID NO:14、15及16的LCDR1、LCDR2及LCDR3序列。

[0100] 在一些实施方案中, 本发明提供一种经分离抗体或其抗原结合片段, 其结合人TSLP且包含分别为SEQ ID NO:1、2及3的HCDR1、HCDR2及HCDR3序列, 及分别为SEQ ID NO:11、12及13的LCDR1、LCDR2及LCDR3序列。

[0101] 在一些实施方案中, 本发明提供一种经分离抗体或其抗原结合片段, 其结合人TSLP且包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:7的VH及含有氨基酸序列SEQ ID NO:17的VL。

[0102] 在一些实施方案中, 本发明提供一种经分离抗体或其抗原结合片段, 其结合人TSLP且包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:22的重链及含有氨基酸序列SEQ ID NO:25的轻链。

[0103] 在一些实施方案中, 本发明提供一种经分离抗体或其抗原结合片段, 其结合人TSLP且包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:9的重链及含有氨基酸序列SEQ ID NO:19的轻链。

[0104] 如本文所用, 若抗体的可变区或全长链获自使用人胚系免疫球蛋白基因的系统, 则人抗体包含为特定胚系序列“的产物”或“来源于”其的重链或轻链可变区或全长重链或轻链。此类系统包括用感兴趣的抗原使携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠免疫或用感兴趣的抗原筛选展示在噬菌体上的人免疫球蛋白基因文库。作为人胚系免疫球蛋白序列“的产物”或“来源于”人胚系免疫球蛋白序列的人抗体可通过如下鉴别: 将人抗体的氨基酸序

列与人胚系免疫球蛋白的氨基酸序列进行比较且选择序列最接近(即最大%同一性)人抗体序列的人胚系免疫球蛋白序列。与胚系序列相比,作为特定人胚系免疫球蛋白序列“的产物”或“来源于”特定人胚系免疫球蛋白序列的人抗体可含有氨基酸差异,其归因于例如天然存在的体细胞突变或有意引入的定点突变。然而,在VH或VL框架区中,所选人抗体通常在氨基酸序列上与由人胚系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列至少90%一致,且含有当与其他物种的胚系免疫球蛋白氨基酸序列(例如鼠胚系序列)相比时鉴别人抗体为人的氨基酸残基。在某些情况下,人抗体可在氨基酸序列上与由胚系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列至少60%、70%、80%、90%、或至少95%、或甚至至少96%、97%、98%或99%一致。通常,重组人抗体将在VH或VL框架区中显示与由人胚系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列的不超过10个氨基酸差异。在某些情况下,人抗体可显示与由胚系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列的不超过5个、或甚至不超过4、3、2或1个氨基酸差异。

同源抗体

[0105] 在另一实施方案中,本发明提供一种包含与表2中所述的序列同源的氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段,且该抗体结合于TSLP并保留表2中所述的那些抗体的所需功能特性。

[0106] 举例而言,本发明提供一种经分离单克隆抗体(或其抗原结合片段),其包含重链可变区(VH)及轻链可变区(VL),其中VH包含与选自SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少80%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列;VL包含与选自SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少80%、至少90%或至少95%一致的氨基酸序列;该抗体特异性结合于TSLP蛋白质且抑制TSLP。

[0107] 在一个实施方案中,VH和/或VL氨基酸序列可与表2中阐述的序列50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。在一个实施方案中,除不超过1、2、3、4或5个氨基酸位置中的氨基酸取代外,VH和/或VL氨基酸序列可一致。具有与表2中所述的那些抗体的VH及VL区具有高(即80%或大于80%)同一性的VH及VL区的抗体可通过分别编码SEQ ID NO:8或21或SEQ ID NO:18或24的核酸分子的诱变(例如定点或PCR介导的诱变)、接着使用本文所述的功能分析测试编码改变的抗体的保留功能来获得。

[0108] 在一个实施方案中,全长重链和/或全长轻链氨基酸序列可与表2中阐述的序列50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。具有与SEQ ID NO:9的全长重链及SEQ ID NO:19的全长轻链具有高(即80%或大于80%)同一性的全长重链及全长轻链的抗体可通过分别编码此类多肽的核酸分子的诱变(例如定点或PCR介导的诱变)、接着使用本文所述的功能分析测试编码改变的抗体的保留功能来获得。

[0109] 在一个实施方案中,全长重链和/或全长轻链核苷酸序列可与表2中阐述的序列60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。

[0110] 在一个实施方案中,重链和/或轻链核苷酸序列的可变区可与表2中阐述的序列60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%一致。

[0111] 如本文所用,两个序列之间的同一性百分比为序列所共有的一致位置数的函数(即,%同一性等于一致位置数/总位置数 $\times 100$),考虑为了两个序列的最佳比对而需要引入的空位数及各空位的长度。序列比较及确定两个序列之间的同一性百分比可使用数学算法来达成,如下文非限制性实例中所述。

[0112] 另外或替代地,本发明的蛋白质序列可进一步用作“查询序列”以对公共数据库进行检索,例如鉴别相关序列。举例而言,此类检索可使用Altschul等人,1990J.Mol.Biol.215:403-10的BLAST程序(2.0版)进行。

具有保守修饰的抗体

[0113] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段具有包含CDR1、CDR2及CDR3序列的重链可变区及包含CDR1、CDR2及CDR3序列的轻链可变区,其中这些CDR序列中的一个或多个具有基于本文所述的抗体的指定氨基酸序列或其保守修饰,且其中所述抗体保留本发明的TSLP结合抗体及其抗原结合片段的所需功能特性。因此,本发明提供一种经分离单克隆抗体或其抗原结合片段,其由包含CDR1、CDR2及CDR3序列的重链可变区及包含CDR1、CDR2及CDR3序列的轻链可变区组成,其中:重链可变区CDR1包含选自SEQ ID NO:1、4或5中的任一者的氨基酸序列或其保守变体;重链可变区CDR2包含选自SEQ ID NO:2或6中的任一者的氨基酸序列或其保守变体;重链可变区CDR3包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列或其保守变体;轻链可变区CDR1包含选自SEQ ID NO:11或14中的任一者的氨基酸序列或其保守变体;轻链可变区CDR2包含选自SEQ ID NO:12或15中的任一者的氨基酸序列或其保守变体;及轻链可变区CDR3包含选自SEQ ID NO:13或16中的任一者的氨基酸序列或其保守变体;该抗体或其抗原结合片段特异性结合于TSLP且抑制TSLP。

[0114] 在一些实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段具有重链可变区及轻链可变区,其中重链及轻链可变区具有基于本文所述的抗体的指定氨基酸序列或其保守修饰,且其中抗体保留本发明的TSLP结合抗体及其抗原结合片段的所需功能特性。因此,本发明提供一种经分离单克隆抗体或其抗原结合片段,其由重链可变区及轻链可变区组成,其中:重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列或其保守变体;轻链可变区包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列或其保守变体;该抗体或其抗原结合片段特异性结合于TSLP且抑制TSLP。

结合于相同表位的抗体

[0115] 本发明提供与表2中所列出的TSLP结合抗体或抗体片段结合于相同表位的抗体。额外抗体可因此在此TSLP结合分析中基于其与本发明的其他抗体及其抗原结合片段交叉竞争(例如以统计学上显著的方式竞争性抑制其结合)的能力而鉴别。测试抗体抑制本发明的抗体及其抗原结合片段结合于TSLP蛋白质的能力表明测试抗体可与该抗体竞争结合于TSLP;根据非限制性理论,此类抗体可与同其竞争的抗体结合于TSLP上相同或相关(例如结构上类似或空间上邻近)的表位。在一些实施方案中,与本文所揭示的抗体及其抗原结合片段结合于TSLP上相同的表位的抗体为人单克隆抗体。此类人单克隆抗体可如本文所述制备及分离。在一些实施方案中,与本发明的抗体及其抗原结合片段结合于TSLP上相同的表位的抗体为小鼠单克隆抗体。在某些实施方案中,与本文所揭示的抗体及其抗原结合片段结合于TSLP上相同的表位的抗体为来源于小鼠单克隆抗体的人源化单克隆抗体。在某一实施方案中,与本文所揭示的抗体及其抗原结合片段结合于TSLP上相同的表位的抗体为人源化单克隆抗体。此类人源化单克隆抗体可如本文所述制备及分离。

[0116] 在一些实施方案中,本文所提供的单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合人TSLP的表位,其中该表位包含以下残基中的一个或多个:SEQ ID NO:38的Lys38、Ala41、Leu44、Ser45、Thr46、Ser48、Lys49、Ile52、Thr53、Ser56、Gly57、Thr58、Lys59、Lys101、Gln145及Arg149。在一些实施方案中,本文所提供的单克隆抗体或其抗原结合片段特异性

结合人TSLP的表位,其中该表位包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少十一个、至少十二个、至少十三个、至少十四个、至少十五个或所有以下残基:SEQ ID NO:38的Lys38、Ala41、Leu44、Ser45、Thr46、Ser48、Lys49、Ile52、Thr53、Ser56、Gly57、Thr58、Lys59、Lys101、Gln145及Arg149。

[0117] 在一些实施方案中,本文所提供的单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合人TSLP的表位,其中该表位包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个或所有以下残基:SEQ ID NO:38的Lys38、Ala41、Leu44、Ser45、Thr46、Ser48、Lys49、Ile52及Thr53。此类单克隆抗体或其抗原结合片段的表位还可包括以下残基中的一个或多个:SEQ ID NO:38的Ser56、Gly57、Thr58、Lys59、Lys101、Gln145及Arg149。

[0118] 在一些实施方案中,本文所提供的单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合人TSLP的表位,其中该表位包含至少一个、至少两个、至少三个或所有以下残基:SEQ ID NO:38的Ser56、Gly57、Thr58及Lys59。此类单克隆抗体或其抗原结合片段的表位还可包括以下残基中的一个或多个:SEQ ID NO:38的Lys38、Ala41、Leu44、Ser45、Thr46、Ser48、Lys49、Ile52、Thr53、Lys101、Gln145及Arg149。

[0119] 在一些实施方案中,本文所提供的单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合人TSLP的表位,其中该表位包含SEQ ID NO:38的Lys101。此类单克隆抗体或其抗原结合片段的表位还可包括以下残基中的一个或多个:SEQ ID NO:38的Lys38、Ala41、Leu44、Ser45、Thr46、Ser48、Lys49、Ile52、Thr53、Ser56、Gly57、Thr58、Lys59、Gln145及Arg149。

[0120] 在一些实施方案中,本文所提供的单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合人TSLP的表位,其中该表位包含SEQ ID NO:38的Gln145或Arg149。在一些实施方案中,本文所提供的单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合人TSLP的表位,其中该表位包含SEQ ID NO:38的Gln145及Arg149。此类单克隆抗体或其抗原结合片段的表位还可包括以下残基中的一个或多个:SEQ ID NO:38的Lys38、Ala41、Leu44、Ser45、Thr46、Ser48、Lys49、Ile52、Thr53、Ser56、Gly57、Thr58、Lys59及Lys101。

[0121] 在一些实施方案中,本文所提供的单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合人TSLP的表位,其中该表位包含至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个或所有以下残基:SEQ ID NO:38的Lys49、Ile52、Gly57、Lys59、Lys101、Gln145及Arg149。在一些实施方案中,本文所提供的单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合人TSLP的表位,其中该表位包含所有以下残基:SEQ ID NO:38的Lys49、Ile52、Gly57、Lys59、Lys101、Gln145及Arg149。

[0122] 在一些实施方案中,本文所提供的单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合人TSLP的表位,其中该表位包含SEQ ID NO:38的以下各组残基中的至少一组:(a) Lys49及Ile52、(b) Gly57及Lys59、(c) Lys101、(d) Gln145及Arg149。在一些实施方案中,本文所提供的单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合人TSLP的表位,其中该表位包含SEQ ID NO:38的Lys49及Ile52。在一些实施方案中,本文所提供的单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合人TSLP的表位,其中该表位包含SEQ ID NO:38的Gly57及Lys59。在一些实施方案中,本文所提供的单克隆抗体或其抗原结合片段特异性结合人TSLP的表位,其中该表位包含SEQ ID NO:38的Lys101。在一些实施方案中,本文所提供的单克隆抗体或其抗原结合片段特异

性结合人TSLP的表位,其中该表位包含SEQ ID NO:38的Gln145及Arg149。

[0123] 在一些实施方案中,TSLP结合分子可包含具有至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、至少五个、至少六个、至少七个、至少八个、至少九个、至少十个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个或所有以下残基的互补位:重链序列SEQ ID NO:22的Thr28、Asp31、Tyr32、Trp33、Asp56、Glu101、Ile102、Tyr103、Tyr104、Tyr105或轻链序列SEQ ID NO:25的Gly28、Ser29、Lys30、Tyr31、Tyr48、Asp50、Asn51、Glu52、Asn65及Trp92。

[0124] 一旦确定抗原上的所需表位,则可例如使用本发明中所述的技术产生针对该表位的抗体。或者,在探索过程期间,抗体的产生及表征可阐明关于所需表位的信息。根据此信息,随后可竞争性筛选结合于相同表位的抗体。一种达成此举的方法为进行交叉竞争研究,以寻找彼此竞争性结合的抗体,例如竞争结合于抗原的抗体。基于交叉竞争将抗体“分格”的高通量方法描述于国际专利申请第WO 2003/48731号中。如本领域技术人员应了解,实际上抗体可特异性结合的任何物质均可作为表位。表位可包含抗体结合的那些残基。

[0125] 一般而言,特异性针对特定目标抗原的抗体将优先识别蛋白质和/或大分子的复合混合物中目标抗原上的表位。

[0126] 包括表位的给定多肽区可使用本领域中熟知的多种表位定位技术鉴别。参见例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷(Glenn E.Morris编,1996)Humana Press,Totowa,New Jersey。举例而言,线性表位例如可通过如下测定:在固体支撑物上同时合成大量肽,该肽对应于蛋白质分子的部分,且使该肽与抗体反应,而该肽仍附接于支撑物。此类技术为本领域中已知的且描述于例如美国专利第4,708,871号;Geysen等人,(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:3998-4002;Geysen等人,(1985)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:78-182;Geysen等人,(1986)Mol.Immunol.23:709-715中。类似地,构象表位容易通过测定氨基酸TSLP的空间构象来鉴别,诸如通过例如氢/氘交换、X射线结晶学及二维核磁共振。参见例如Epitope Mapping Protocols,见上文。蛋白质的抗原区还可使用标准抗原性及亲水性图来鉴别,诸如使用例如获自Oxford Molecular Group的Omiga 1.0版软件程序计算的图来鉴别。为测定抗原性简况(profile),此计算机程序采用Hopp/Woods方法,Hopp等人,(1981)Proc.Natl.Acad.Sci USA 78:3824-3828;且对于亲水性图,采用Kyte-Doolittle技术,Kyte等人,(1982)J.Mol.Biol.157:105-132。

经工程改造及修饰的抗体

[0127] 本发明的抗体另外可使用具有一个或多个VH和/或VL序列的抗体作为起始材料以对经修饰的抗体进行工程改造来制备,该经修饰的抗体可相对于起始抗体具有改变的特性。抗体可通过修饰一个或两个可变区(即VH和/或VL)内,例如一个或多个CDR区内和/或一个或多个框架区内的一个或多个残基来进行工程改造。另外或替代地,抗体可通过修饰恒定区内的残基来进行工程改造,例如以改变抗体的效应功能。

[0128] 可进行的一种类型的可变区工程改造为CDR接枝。抗体主要通过位于六个重链及轻链互补决定区(CDR)的氨基酸残基与目标抗原相互作用。出于此原因,在各个抗体之间,CDR内的氨基酸序列与CDR外的序列相比更加多样化。由于CDR序列负责大部分抗体-抗原相互作用,故可通过构建表达载体来表达模拟天然存在的特定抗体的特性的重组抗体,所述表达载体包括接枝于具有不同特性的不同抗体的框架序列上的来自天然存在的特定抗体

的CDR序列(参见例如Riechmann,L.等人,1998Nature 332:323-327;Jones,P.等人,1986Nature 321:522-525;Queen,C.等人,1989Proc.Natl.Acad.,U.S.A.86:10029-10033;Winter的美国专利第5,225,539号及Queen等人的美国专利第5,530,101号、第5,585,089号、第5,693,762号及第6,180,370号)。

[0129] 此类框架序列可自包括胚系抗体基因序列或重排抗体序列的公共DNA数据库或公开参考文献获得。举例而言,人重链及轻链可变区基因的胚系DNA序列可见于“VBase”人胚系序列数据库(可在因特网上在www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase获得)以及Kabat,E.A.等人,1991Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH公开号91-3242;Tomlinson,I.M.等人,1992J.fol.Biol.227:776-798;及Cox,J.P.L.等人,1994Eur.J Immunol.24:827-836;其中的每一者的内容以引用的方式明确地并入本文中。举例而言,人重链及轻链可变区基因的胚系DNA序列及重排抗体序列可见于“IMGT”数据库(可在因特网上在www.imgt.org获得;参见Lefranc,M.P.等人,1999Nucleic Acids Res.27:209-212;其中的每一者的内容以引用的方式明确地并入本文中)。

[0130] 用于本发明的抗体及其抗原结合片段的框架序列的实例为结构上类似于供所选的本发明的抗体及其抗原结合片段使用的框架序列(例如供本发明的单克隆抗体使用的共同序列和/或框架序列)的框架序列。VH CDR1、2及3序列及VL CDR1、2及3序列可接枝于框架区上,所述框架区具有与获得框架序列的胚系免疫球蛋白基因中所发现的序列一致的序列,或CDR序列可接枝于与胚系序列相比含有一个或多个突变的框架区上。举例而言,已发现,在某些情况下,使框架区内的残基突变有益于维持或增强抗体的抗原结合能力(参见例如Queen等人的美国专利第5,530,101号;第5,585,089号;第5,693,762号及第6,180,370号)。

[0131] 另一类型的可变区修饰为使VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基突变,以由此改进感兴趣的抗体的一种或多种结合特性(例如亲和力),称为“亲和力成熟”。可进行定点诱变或PCR介导的诱变以引入突变及可在如本文所述及实例中所提供的体外或体内分析中评估对抗体结合的影响,或感兴趣的其他功能特性。可引入保守修饰(如上文所论述)。突变可为氨基酸取代、添加或缺失。此外,通常,在CDR区内改变不超过一个、两个、三个、四个或五个残基。

[0132] 可采用广泛多种抗体/免疫球蛋白框架或支架,只要所得多肽包括至少一个特异性结合于TSLP的结合区即可。此类框架或支架包括5种主要个体基因型的人免疫球蛋白、其抗原结合片段,且包括其他动物物种的免疫球蛋白,其优选具有人源化方面。单重链抗体(诸如在骆驼中鉴别的抗体)在此方面备受关注。本领域技术人员不断地发现及开发新的框架、支架及片段。

[0133] 在一个方面,本发明涉及一种使用其上可接枝本发明的CDR的非免疫球蛋白支架产生基于非免疫球蛋白的抗体的方法。可采用已知或未来非免疫球蛋白框架及支架,只要其包含特异性针对目标TSLP蛋白质的结合区即可。已知非免疫球蛋白框架或支架包括(但不限于)纤连蛋白(Compound Therapeutics,Inc.,Waltham,Mass.)、锚蛋白(Molecular Partners AG,Zurich,Switzerland)、结构域抗体(Domantis,Ltd.,Cambridge,UK及Ablynx nv,Zwijnaarde,Belgium)、脂质运载蛋白(Pieris Proteolab AG,Freising,Germany)、小

模块免疫药物 (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, Wash.)、最大抗体 (Avidia, Inc., Mountain View, Calif.)、蛋白质A (Affibody AG, Sweden) 及阿菲林 (affilin) (γ -晶状体蛋白或泛素) (SciI Proteins GmbH, Halle, Germany)。

[0134] 纤连蛋白支架基于III型纤连蛋白结构域(例如III型纤连蛋白的第十模块(10Fn3结构域))。III型纤连蛋白结构域具有分布在两个 β 片层之间的7或8个 β 链,其自身抵靠着彼此填塞以形成蛋白质的核心,且另外含有使 β 链彼此连接且暴露于溶剂的环(类似于CDR)。在 β 片层夹心的各边缘处存在至少三个此类环,其中边缘为垂直于 β 链方向的蛋白质边界(参见美国专利第6,818,418号)。这些基于纤连蛋白的支架并非免疫球蛋白,但总体折叠与包含骆驼及马IgG的完整抗原识别单元的最小功能抗体片段(重链可变区)的折叠紧密相关。由于此结构,故非免疫球蛋白抗体模拟在性质及亲和力上与抗体的抗原结合特性类似的抗原结合特性。这些支架可用于类似于体内抗体的亲和力成熟过程的体外随机化及改组策略中。这些基于纤连蛋白的分子可用作支架,其中分子的环区可使用标准克隆技术而经本发明的CDR置换。

[0135] 锚蛋白技术基于使用具有锚蛋白源重复模块作为携有可用于结合于不同目标的可变区的支架的蛋白质。锚蛋白重复模块为由两个反向平行 α -螺旋及 β -转角组成的33个氨基酸多肽。可变区的结合主要通过使用核糖体展示来优化。

[0136] 高亲和性多聚体(avimers)来源于含有天然A结构域的蛋白质,诸如LRP-1。这些结构域本质上用于蛋白质-蛋白质相互作用,且在人中多于250种蛋白质在结构上基于A结构域。高亲和性多聚体由通过氨基酸接头连接的多个不同“A结构域”单体(2-10个)组成。可结合于目标抗原的高亲和性多聚体可使用例如美国专利申请公开第20040175756号;第20050053973号;第20050048512号;及第20060008844号中所述的方法产生。

[0137] 亲和抗体亲和配体为由三螺旋束构成的小的简单蛋白质,该三螺旋束基于蛋白质A的IgG结合结构域中的一个的支架。蛋白质A为来自细菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的表面蛋白质。此支架结构域由58个氨基酸组成,其中13个随机化以产生具有大量配体变体的亲和抗体文库(参见例如美国专利第5,831,012号)。亲和抗体分子模拟抗体,与分子量为150kDa的抗体相比,其分子量为6kDa。尽管尺寸小,但亲和抗体分子的结合位点与抗体的结合位点类似。

[0138] 抗运载蛋白(Anticalin)为由公司Pieris ProteoLab AG开发的产品。其来源于脂质运载蛋白(一组广泛的小型稳健蛋白质,其通常涉及化学敏感或不溶化合物的生理转运或储存)。数种天然脂质运载蛋白存在于人组织或体液中。蛋白质架构使人联想到免疫球蛋白,其中高变环位于刚性框架的顶部。然而,与抗体或其重组片段相比,脂质运载蛋白由具有160至180个氨基酸残基的单个多肽链构成,该多肽链仅略大于单个免疫球蛋白结构域。一组构成结合袋的四个环显示明显的结构可塑性且包容多个侧链。结合位点因此可以专有工艺再成形从而以高亲和性及特异性识别不同形状的指定目标分子。脂质运载蛋白家族的一种蛋白质,即大菜粉蝶(*Pieris Brassicae*)之后胆色素结合蛋白(BBP),已用于通过诱变一组四个环而开发抗运载蛋白。描述抗运载蛋白的专利申请的一个实例在PCT公开第W0199916873号中。

[0139] 阿菲林分子为小型非免疫球蛋白蛋白质,其经设计以对蛋白质及小分子具有特异性亲和力。新阿菲林分子可极快速地选自两个文库,各文库均基于不同的人源支架蛋白。阿

菲林分子对免疫球蛋白蛋白质不显示任何结构同源性。目前使用两种阿菲林支架,其中的一种为 γ 晶体(人结构性眼晶状体蛋白质),且另一种为“泛素”超家族蛋白质。两种人支架均极小,显示高温稳定性且对pH值变化及变性剂几乎具有抗性。此高稳定性主要归因于蛋白质的 β 片层结构扩大。 γ 晶体源蛋白质的实例描述于W0200104144中且“泛素样”蛋白质的实例描述于W02004106368中。

[0140] 蛋白质表位模拟物(PEM)为模拟蛋白质的 β 发夹二级结构(涉及蛋白质-蛋白质相互作用的主要二级结构)的中型、环状、肽样分子(MW 1-2kDa)。

[0141] 人TSLP结合抗体可使用本领域中已知的方法产生。举例而言,人工程改造技术用于将非人抗体转变成经工程改造的人抗体。美国专利公开第20050008625号描述一种用人可变区置换抗体中的非人抗体可变区同时相对于非人抗体维持相同或提供更好的结合特征的体内方法。该方法依赖于表位引导的用全人抗体对非人参考抗体可变区的置换。所得人抗体一般在结构上与参考非人抗体不相关,但与参考抗体结合于相同抗原上的相同表位。简言之,通过在对测试抗体与抗原的结合起反应的报告系统存在下,在细胞中建立“竞争者”与参考抗体的多样杂交文库(“测试抗体”)之间结合于有限量的抗原的竞争来实现连续表位引导的互补置换方法。竞争者可为参考抗体或其衍生物,诸如单链Fv片段。竞争者还可为抗原的天然或人工配体,其与参考抗体结合于相同表位。竞争者的唯一要求为其与参考抗体结合于相同表位,且其与参考抗体竞争结合抗原。测试抗体共同地具有一个来自非人参考抗体的抗原结合V区,且另一V区随机选自诸如人抗体谱系文库的不同来源。来自参考抗体的共同V区充当引导,将测试抗体定位于抗原上的相同表位上,且呈相同方向,使得选择偏向与参考抗体的最高抗原结合保真度。

[0142] 许多类型的报告系统可用于检测测试抗体与抗原之间的所需相互作用。举例而言,互补报告片段可分别连接于抗原及测试抗体,使得仅仅当测试抗体结合于抗原时发生通过片段互补的报告活化。当测试抗体-和抗原报告片段融合物与竞争者共表达时,报告活化变得视测试抗体与竞争者竞争的能力而定,该能力与测试抗体对抗原的亲合力成比例。可使用的其他报告系统包括如美国专利申请序列号10/208,730(公开第20030198971号)中所揭示的自体抑制报告再活化系统(RAIR)的再活化子,或美国专利申请序列号10/076,845(公开第20030157579号)中所揭示的竞争活化系统。

[0143] 使用连续表位引导的互补置换系统,进行选择以鉴别表达单个测试抗体以及竞争者、抗原及报告组分的细胞。在这些细胞中,各测试抗体与竞争者一对一竞争结合于有限量的抗原。报告的活性与结合于测试抗体的抗原的量成比例,该量又与测试抗体对抗原的亲合力及测试抗体的稳定性成比例。测试抗体最初基于当表达为测试抗体时其相对于参考抗体的活性选择。第一轮选择的结果为一组“杂合”抗体,各由来自参考抗体的相同非人V区及来自文库的人V区构成,且各结合与参考抗体结合的抗原上表位相同的表位。第一轮中选择的更多杂合抗体中的一种具有与参考抗体相当或高于其的对抗原的亲合力。

[0144] 在第二V区置换步骤中,在第一步骤中选择的人V区用作引导,用于选择同源人V区的不同文库对剩余非人参考抗体V区的人置换。第一轮中选择的杂合抗体还可用作第二轮选择的竞争者。第二轮选择的结果为一组全人抗体,其结构上不同于参考抗体,但与参考抗体竞争结合于相同抗原。一些所选人抗体与参考抗体结合于相同抗原上的相同表位。在这些所选人抗体中,一个或多个以与参考抗体相当或高于其的亲合力结合于相同表位。

骆驼科抗体

[0145] 自骆驼及单峰驼(双峰骆驼(*Camelus bactrianus*)及单峰骆驼(*Camelus dromaderius*))家族成员(包括新世界成员,诸如骆马物种(羊驼(*Lama pacos*)、大羊驼(*Lama glama*)及瘦驼(*Lama vicugna*)))获得的抗体蛋白已在尺寸、结构复杂性及对人受试者的抗原性方面加以表征。如自然界中所发现的来自此哺乳动物家族的某些IgG抗体缺少轻链,且因此在结构上不同于其他动物抗体的具有两条重链及两条轻链的典型四链四级结构。参见PCT/EP93/02214(1994年3月3日公开的WO 94/04678)。

[0146] 作为鉴别为VHH的小型单可变结构域的骆驼科抗体区可通过基因工程改造获得,以产生对目标具有高亲和力的小蛋白质,产生称作“骆驼科纳米抗体”的衍生自抗体的低分子量蛋白质。参见1998年6月2日颁布的美国专利第5,759,808号;还参见Stijlemans,B.等人,2004J Biol Chem 279:1256-1261;Dumoulin,M.等人,2003Nature 424:783-788;Pleschberger,M.等人2003Bioconjugate Chem 14:440-448;Cortez-Retamozo,V.等人2002Int J Cancer89:456-62;及Lauwereys,M.等人1998EMBO J 17:3512-3520。经工程改造的骆驼科抗体及抗体片段的文库可购自例如Ablynx,Ghent,Belgium。如同非人来源的其他抗体及其抗原结合片段,骆驼科抗体的氨基酸序列可以重组方式改变,以获得更紧密类似人序列的序列,即纳米抗体可“人源化”。由此,可进一步减小骆驼科抗体对人的天然低抗原性。

[0147] 骆驼科纳米抗体的分子量为人IgG分子的约十分之一,且蛋白质的物理直径仅为几纳米。小尺寸的一种结果为骆驼科纳米抗体能够结合于较大抗体蛋白质在功能上不可见的抗原位点,即,骆驼科纳米抗体适用作检测抗原(否则使用经典免疫技术,该抗原会隐匿)的试剂,及适用作可能的治疗剂。因此,小尺寸的又一结果为骆驼科纳米抗体由于结合于目标蛋白的凹槽或窄隙中的特定位点而可具抑制作用,且因此相比于经典抗体的功能,可以更紧密类似于经典低分子量药物的功能的能力来发挥作用。

[0148] 低分子量及紧凑尺寸进一步使骆驼科纳米抗体具极端热稳定性、对极端pH值及蛋白水解消化具稳定性及小的抗原性。另一结果为骆驼科纳米抗体容易自循环系统移至组织中,且甚至跨过血脑屏障且可治疗影响神经组织的疾患。纳米抗体可进一步促进药物跨过血脑屏障转运。参见2004年8月19日公开的美国专利申请20040161738。这些特征与对人的低抗原性组合指示巨大治疗潜力。另外,这些分子可在诸如大肠杆菌的原核细胞中完全表达,且用噬菌体表达为融合蛋白且具功能性。

[0149] 因此,本发明的特征为对TSLP具有高亲和力的骆驼科抗体或纳米抗体。在本文中的一个实施方案中,骆驼科抗体或纳米抗体在骆驼科动物中天然产生,即,使用本文关于其他抗体描述的技术由骆驼科在用TSLP或其肽片段进行免疫接种后产生。或者,TSLP结合骆驼科纳米抗体经工程改造,即通过如本文实例中所述,使用淘选程序以TSLP作为目标自例如展示适当诱变的骆驼科纳米抗体蛋白质的噬菌体文库选择来产生。经工程改造的纳米抗体可进一步通过遗传工程改造定制以使其在接受受试者中的半衰期为45分钟至2周。在一特定实施方案中,骆驼科抗体或纳米抗体通过将本发明的人抗体的重链或轻链的CDR序列接枝至纳米抗体或单结构域抗体框架序列中来获得,如例如PCT/EP93/02214中所述。

双特异性分子及多价抗体

[0150] 在另一方面,本发明的特征在于包含本发明的TSLP结合抗体或其片段的双特异性

或多特异性分子。本发明的抗体或其抗原结合片段可经衍生化或连接于另一功能分子,例如另一肽或蛋白质(例如另一抗体或受体的配体),以产生结合于至少两个不同结合位点或目标分子的双特异性分子。本发明的抗体可实际上经衍生化或连接于超过一种其他功能分子,以产生结合于超过两个不同结合位点和/或目标分子的多特异性分子;此类多特异性分子还意欲由如本文所用的术语“双特异性分子”涵盖。为产生本发明的双特异性分子,本发明的抗体可在功能上与一个或多个其他结合分子(诸如另一抗体、抗体片段、肽或结合模拟剂)连接(例如通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或以其他方式连接),从而产生双特异性分子。

[0151] 因此,本发明包括包含至少一种针对TSLP的第一结合特异性及针对第二目标表位的第二结合特异性的双特异性分子。举例而言,第二目标表位可为不同于第一目标表位的另一TSLP表位。在其他实施方案中,第二目标表位可为与TSLP不相关的目标,但其与TSLP组合提供治疗效益。

[0152] 另外,就本发明中双特异性分子具多特异性而言,除第一及第二目标表位外,分子可进一步包括第三结合特异性。

[0153] 在一个实施方案中,本发明的双特异性分子包含至少一种抗体或其抗体片段(包括例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或单链Fv)作为结合特异性。抗体还可为轻链或重链二聚体或其任何最小片段,诸如Fv或单链构建体,如Ladner等人的美国专利第4,946,778号中所述。

[0154] 双抗体为二价双特异性分子,其中VH及VL结构域在单个多肽链上表达,其由过短而不容许同一链上的两个结构域之间配对的接头连接。VH及VL结构域与另一链的互补结构域配对,由此产生两个抗原结合位点(参见例如Holliger等人,1993Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poijak等人,1994Structure 2:1121-1123)。双抗体可通过在同一细胞内表达具有结构VHA-VLB及VHB-VLA(VH-VL构型)或VLA-VHB及VLB-VHA(VL-VH构型)的两个多肽链来产生。其中大多数可在细菌中以可溶形式表达。单链双抗体(scDb)通过用大约15个氨基酸残基的接头连接两条形成双抗体的多肽链来产生(参见Holliger及Winter,1997Cancer Immunol.Immunother.,45(3-4):128-30;Wu等人,1996Immunotechnology,2(1):21-36)。scDb可在细菌中以可溶的活性单体形式表达(参见Holliger及Winter,1997Cancer Immunol.Immunother.,45(34):128-30;Wu等人,1996Immunotechnology,2(1):21-36;Pluckthun及Pack,1997Immunotechnology,3(2):83-105;Ridgway等人,1996Protein Eng.,9(7):617-21)。双抗体可与Fc融合以产生“二-双抗体”(参见Lu等人,2004J.Biol.Chem.,279(4):2856-65)。

[0155] 可用于本发明的双特异性分子中的其他抗体为鼠、嵌合及人源化单克隆抗体。

[0156] 本发明的双特异性分子可通过使用本领域中已知的方法将组成型结合特异性缀合来制备。举例而言,双特异性分子各结合特异性可分别产生,接着彼此缀合。当结合特异性为蛋白质或肽时,可使用多种偶联剂或交联剂进行共价缀合。交联剂的实例包括蛋白质A、碳化二亚胺、N-丁二酰亚氨基-5-乙酰基-硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫基双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻仲苯基二顺丁烯二酰亚胺(oPDM)、N-丁二酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)及4-(N-顺丁烯二酰亚氨基甲基)环己烷-1-甲酸磺基丁二酰亚氨基酯(磺基-SMCC)(参见例如Karpovsky等人,1984J.Exp.Med.160:1686;Liu,M A等人,1985Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:8648)。其他方法包括Paulus,1985Behring Ins.Mitt.

第78期, 118-132; Brennan等人, 1985 Science 229:81-83) 及Glennie等人, 1987 J. Immunol. 139:2367-2375) 中所述的方法。缀合剂为SATA及碘基-SMCC, 两者均购自Pierce Chemical Co. (Rockford, Ill.)。

[0157] 当结合特异性为抗体时, 其可通过两条重链的C端铰链区的硫氢基键来缀合。在一特定实施方案中, 在缀合前, 铰链区经修饰以含有奇数个硫氢基残基, 例如一个。

[0158] 或者, 两种结合特异性可在同一载体中编码, 且在同一宿主细胞中表达及组装。此方法特别适用于双特异性分子为mAb×mAb、mAb×Fab、Fab×F(ab')₂或配体×Fab融合蛋白的情况中。本发明的双特异性分子可为包含一个单链抗体及一个结合决定簇的单链分子, 或包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性分子可包含至少两个单链分子。用于制备双特异性分子的方法描述于例如美国专利第5,260,203号; 美国专利第5,455,030号; 美国专利第4,881,175号; 美国专利第5,132,405号; 美国专利第5,091,513号; 美国专利第5,476,786号; 美国专利第5,013,653号; 美国专利第5,258,498号; 及美国专利第5,482,858号中。

[0159] 双特异性分子与其特异性目标的结合可通过例如酶联免疫吸附剂分析(ELISA)、放射免疫分析(REA)、FACS分析、生物分析(例如生长抑制)或蛋白质印迹分析来确认。这些分析中的每一个一般通过采用特异性针对感兴趣的复合物的经标记试剂(例如抗体)检测尤其感兴趣的蛋白质-抗体复合物的存在。

[0160] 在另一方面, 本发明提供包含至少两个本发明的抗体及其抗原结合片段结合于TSLP的相同或不同抗原结合部分的多价化合物。抗原结合部分可通过蛋白质融合或共价或非共价键连接在一起。或者, 已描述双特异性分子的键联方法。四价化合物可例如通过使本发明的抗体及其抗原结合片段与结合于本发明的抗体及其抗原结合片段的恒定区(例如Fc或铰链区)的抗体或抗原结合片段交联来获得。

[0161] 三聚结构域描述于例如Borean Pharma的专利EP 1 012 280B1中。五聚模块描述于例如PCT/EP97/05897中。

半衰期延长的抗体

[0162] 本发明提供特异性结合于TSLP且体内半衰期延长的抗体。

[0163] 许多因素可影响蛋白质的体内半衰期。举例而言, 肾过滤、肝脏中的代谢、蛋白水解酶(蛋白酶)降解及免疫原性反应(例如通过抗体中和蛋白质及由巨噬细胞及树突细胞吸收)。多种策略可用于延长本发明的抗体及其抗原结合片段的半衰期。举例而言, 通过与聚乙二醇(PEG)、reCODE PEG、抗体支架、聚唾液酸(PSA)、羟乙基淀粉(HES)、白蛋白结合配体及碳水化合物遮蔽物化学键联; 通过与结合于血清蛋白质(诸如白蛋白、IgG、FcRn)的蛋白质遗传融合及转移; 通过与结合于血清蛋白质的其他结合部分(诸如纳米抗体、Fab、DARPin、高亲和性多聚体、亲和抗体及抗运载蛋白)偶联(遗传地或化学地); 通过与rPEG、白蛋白、白蛋白结构域、白蛋白结合蛋白及Fc遗传融合; 或通过并入纳米载体、缓释制剂或医学装置中。

[0164] 为了延长抗体的体内血清循环, 诸如高分子量PEG的惰性聚合物分子可使用或不使用多官能性接头、通过PEG与抗体的N端或C端的位点特异性缀合或通过存在于赖氨酸残基上的ε氨基连接于抗体或其片段。为使抗体聚乙二醇化, 通常使抗体或其抗原结合片段与聚乙二醇(PEG)(诸如PEG的反应性酯或醛衍生物)在使一个或多个PEG基团附接于抗体或抗

体片段的条件下反应。聚乙二醇化可通过与反应性PEG分子(或类似反应性水溶聚合物)的酰化反应或烷基化反应来进行。如本文所用,术语“聚乙二醇”意欲涵盖已用于衍生其他蛋白质的任一种PEG形式,诸如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-顺丁烯二酰亚胺。在一个实施方案中,待聚乙二醇化的抗体为去糖基化抗体。将使用使生物活性损失降至最低的直链或支链聚合物衍生化。缀合度可通过SDS-PAGE及质谱密切监测以确保PEG分子与抗体的适当缀合。未反应的PEG可通过尺寸排阻或通过离子交换色谱法而与抗体-PEG缀合物分离。可使用本领域技术人员熟知的方法(例如本文所述的免疫分析)测试PEG衍生化抗体的结合活性以及体内功效。用于蛋白质聚乙二醇化的方法为本领域中已知的且可应用于本发明的抗体及其抗原结合片段。参见例如Nishimura等人的EP 0 154 316及Ishikawa等人的EP 0 401 384。

[0165] 其他经修饰的聚乙二醇化技术包括重建化学正交导引工程改造技术(ReCODE PEG),其通过包括tRNA合成酶及tRNA的重建系统将化学上特定的侧链并入生物合成蛋白质中。此技术实现将超过30个新氨基酸并入大肠杆菌、酵母及哺乳动物细胞中的生物合成蛋白质中。tRNA将规范氨基酸并入琥珀密码子所位于的任何位置,将琥珀自终止密码子转换成信号传导化学指定氨基酸的并入的密码子。

[0166] 重组聚乙二醇化技术(rPEG)还可用于延长血清半衰期。此技术包括以遗传方式将300至600个氨基酸非结构化蛋白质尾与现有药物蛋白质融合。由于此类非结构化蛋白质链的表观分子量比其实际分子量大约15倍,因此蛋白质的血清半衰期大大延长。与需要化学缀合及再纯化的传统聚乙二醇化相比,此制备方法大大简化且产物为均质的。

[0167] 另一技术为聚唾液酸化,其使用天然聚合物聚唾液酸(PSA)延长治疗性肽及蛋白质的有效寿命且改进稳定性。PSA为唾液酸聚合物(一种糖)。当用于递送蛋白质及治疗性肽药物时,聚唾液酸为缀合物提供保护性微环境。这提高治疗性蛋白质在循环中的有效寿命且防止其被免疫系统识别。PSA聚合物天然发现于人体中。进化逾数百万年的某些细菌采用PSA聚合物覆盖其壁。这些天然聚唾液酸化细菌接着能够借助于分子拟态来阻挡人体防御系统。此类细菌中可容易产生大量且具有预定物理特征的PSA(天然的终极隐匿技术)。由于细菌PSA与人体中的PSA在化学上相同,因此细菌PSA完全不具免疫原性,即使与蛋白质偶联。

[0168] 另一技术包括使用连接于抗体的羟乙基淀粉(“HES”)衍生物。HES为来源于蜡质玉米淀粉的经修饰的天然聚合物,且可通过身体的酶代谢。通常施用HES溶液以取代血容量不足及改进血液的流变特性。抗体的羟乙基淀粉化能够通过提高分子稳定性以及通过减小肾清除率而延长循环半衰期,从而提高生物活性。通过改变不同参数,诸如HES分子量,可定制广泛范围的HES抗体缀合物。

[0169] 还可通过将一或多个氨基酸修饰(即取代、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选Fc或铰链Fc结构域片段)中来产生体内半衰期延长的抗体。参见例如国际公开第W0 98/23289号;国际公开第W0 97/34631号;及美国专利第6,277,375号。

[0170] 此外,抗体可缀合于白蛋白,以制备在体内更稳定或具有更长体内半衰期的抗体或抗体片段。所述技术在本领域中熟知,参见例如国际公开第W0 93/15199号、第W0 93/15200号及第W0 01/77137号,及欧洲专利第EP 413,622号。

[0171] 延长半衰期的策略尤其适用于纳米抗体、基于纤连蛋白的结合剂及需要延长体内

半衰期的其他抗体或蛋白质。

抗体缀合物

[0172] 本发明提供特异性结合于TSLP的细胞外结构域的抗体或其抗原结合片段与异源蛋白质或多肽(或其抗原结合片段,优选与至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个或至少100个氨基酸的多肽)重组融合或化学缀合(包括共价及非共价结合)而产生融合蛋白。特别地,本发明提供包含本文所述抗体的抗原结合片段(例如Fab片段、Fd片段、Fv片段、F(ab)2片段、VH结构域、VH CDR、VL结构域或VL CDR)及异源蛋白质、多肽或肽的融合蛋白。使蛋白质、多肽或肽与抗体或抗体片段融合或缀合的方法在本领域中已知。参见例如美国专利第5,336,603号、第5,622,929号、第5,359,046号、第5,349,053号、第5,447,851号及第5,112,946号;欧洲专利EP 307,434号及EP 367,166号;国际公开W0 96/04388号及W0 91/06570号;Ashkenazi等人,1991,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:10535-10539;Zheng等人,1995,J.Immunol.154:5590-5600;及Vil等人,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:11337-11341。

[0173] 其他融合蛋白可通过基因改组(shuffling)、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(统称为“DNA改组”)的技术产生。可使用DNA改组以改变本发明的抗体及其抗原结合片段(例如具有较高亲和力及较低解离速率的抗体及其抗原结合片段)的活性。一般参见美国专利第5,605,793号、第5,811,238号、第5,830,721号、第5,834,252号及第5,837,458号;Patten等人,1997,Curr.Opinion Biotechnol.8:724-33;Harayama,1998,Trends Biotechnol.16(2):76-82;Hansson等人,1999,J.Mol.Biol.287:265-76;及Lorenzo及Blasco,1998,Biotechniques 24(2):308-313(这些专利及公开各自以全文引用的方式并入本文中)。抗体及其抗原结合片段或经编码的抗体及其抗原结合片段可通过在重组前利用易错PCR、随机核苷酸插入或其他方法进行随机诱变而改变。编码特异性结合于TSLP的茎区(stalk region)的抗体其抗原结合片段的多核苷酸可与一个或多个异源分子的一个或多个组分、基序、区段、部分、结构域、片段等重组。

[0174] 此外,抗体及其抗原结合片段可与标记序列(诸如肽)融合以促进纯化。在一个实施方案中,标记氨基酸序列为六组氨酸肽(SEQ ID NO:40),其中诸如pQE载体(QIAGEN, Inc.,9259Eton Avenue,Chatsworth,Calif.,91311)中提供的标签,其中许多可购得。如Gentz等人,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:821-824中所述,例如提供六组氨酸(SEQ ID NO:40)以便于纯化融合蛋白。适用于纯化的其他肽标签包括(但不限于)血球凝集素(“HA”)标签,其对应于来源于流感血球凝集素蛋白的表位(Wilson等人,1984,Cell 37:767),及“FLAG”标签。

[0175] 在一个实施方案中,本发明的抗体及其抗原结合片段、其抗原结合片段缀合于诊断剂或可检测剂。此类抗体可适用于监测或预后疾病或疾患的发作、出现、进展和/或严重程度作为临床测试程序的一部分,诸如测定特定疗法的功效。此类诊断及检测可通过使抗体与可检测物质偶联来实现,所述可检测物质包括(但不限于)各种酶,诸如(但不限于)辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,诸如(但不限于)链霉亲和素/生物素及抗生物素蛋白/生物素;荧光物质,诸如(但不限于)伞酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明(rhodamine)、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红素;发光物质,诸如(但不限于)鲁米诺(luminol);生物发光物质,诸如(但不限于)荧光素酶、荧光素及水母素;放射

性物质,诸如(但不限于)碘(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 及 ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 及 ^{111}In)、锝(^{99}Tc)、铪(^{201}Ti)、镓(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、钯(^{103}Pd)、钼(^{99}Mo)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 及 ^{117}Tl ;及使用各种正电子发射断层摄影的正电子发射金属,及非放射性顺磁金属离子。

[0176] 另外,抗体其抗原结合片段可缀合于治疗部分或药物部分。治疗部分或药物部分不应解释为限于经典化学治疗剂。举例而言,药物部分可为具有所需生物活性的蛋白质、肽或多肽。此类蛋白质可包括例如毒素,诸如相思子毒素、蓖麻毒素A、绿脓杆菌外毒素、霍乱毒素或白喉毒素;蛋白质,诸如肿瘤坏死因子、 α 干扰素、 β 干扰素、神经生长因子、血小板衍生长因子、组织纤维蛋白溶酶原活化因子;细胞凋亡剂;抗血管生成剂;或生物反应调节剂,诸如淋巴因子。

[0177] 此外,抗体可缀合于治疗部分,诸如放射性金属离子,诸如 α -发射体,诸如 ^{213}Bi ;或适用于使放射金属离子(包括(但不限于) ^{131}In 、 ^{131}Lu 、 ^{131}Y 、 ^{131}Ho 、 ^{131}Sm)与多肽缀合的巨环螯合剂。在一个实施方案中,巨环螯合剂为1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA),其可通过接头分子附接于抗体。此类接头分子通常为本领域中已知的且描述于Denardo等人,1998,Clin Cancer Res.4(10):2483-90;Peterson等人,1999,Bioconjug.Chem.10(4):553-7;及Zimmerman等人,1999,Nucl.Med.Biol.26(8):943-50中,其各以全文引用的方式并入。

[0178] 使治疗部分与抗体缀合的技术是熟知的,参见例如Amon等人,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”,于Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy中,Reisfeld等人(编),第243-56页(Alan R.Liss, Inc.1985);Hellstrom等人,“Antibodies For Drug Delivery”,于Controlled Drug Delivery(第2版)中,Robinson等人(编),第623-53页(Marcel Dekker, Inc.1987);Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review”,于Monoclonal Antibodies 84:Biological And Clinical Applications中,Pinchera等人(编),第475-506页(1985);“Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”,于Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy中,Baldwin等人(编),第303-16页(Academic Press 1985)及Thorpe等人,1982,Immunol.Rev.62:119-58。

[0179] 抗体还可附接于固体支撑物,其特别适用于目标抗原的免疫分析或纯化。此类固体支撑物包括(但不限于)玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

编码抗体的核酸

[0180] 本发明提供基本上经纯化的核酸分子,其编码包含上文所述的TSLP抗体的区段或结构域的多肽。此类多核苷酸可编码来自本文所述的TSLP抗体的重链或轻链的至少一个CDR区且通常全部三个CDR区。此类多核苷酸还可编码本文所述的TSLP抗体的重链和/或轻链的全部或基本上全部可变区序列。此类多核苷酸还可编码抗体的可变区及恒定区。因为密码子简并,所以多种核酸序列将编码免疫球蛋白氨基酸序列中的每一个。

[0181] 多核苷酸序列可通过重新固相DNA合成或通过编码TSLP结合抗体或其结合片段的

现有序列(例如如以下实例中所述的序列)的PCR诱变来产生。核酸的直接化学合成可通过本领域中已知的方法实现,诸如Narang等人,1979,Meth.Enzymol.68:90的磷酸三酯法;Brown等人,Meth.Enzymol.68:109,1979的磷酸二酯法;Beaucage等人,Tetra.Lett.,22:1859,1981的氨基磷酸二乙酯法;及美国专利第4,458,066号的固体支撑物法。通过PCR向多核苷酸序列引入突变可如以下文献中所述进行:例如PCR Technology:Principles and Applications for DNA Amplification,H.A.Erlich(编),Freeman Press,NY,NY,1992;PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications,Innis等人(编),Academic Press,San Diego,Calif.,1990;Mattila等人,Nucleic Acids Res.19:967,1991;及Eckert等人,PCR Methods and Applications 1:17,1991。

[0182] 本发明还提供产生上文所述的TSLP结合抗体的表达载体及宿主细胞。各种表达载体可用于表达编码TSLP结合抗体链或结合片段的多核苷酸。基于病毒的表达载体与非病毒表达载体均可用于在哺乳动物宿主细胞中产生抗体。非病毒载体及系统包括质粒、附加型载体(通常具有用于表达蛋白质或RNA的表达盒)及人工染色体(参见例如Harrington等人,Nat Genet.15:345,1997)。举例而言,适用于在哺乳动物(例如人)细胞中表达TSLP结合多核苷酸及多肽的非病毒载体包括pThioHis A、B及C、pcDNA3.1/His、pEBVHis A、B及C(Invitrogen,San Diego,Calif.)、MPSV载体及本领域中已知用于表达其他蛋白质的许多其他载体。适用的病毒载体包括基于反转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒的载体;基于SV40、乳头状瘤病毒、HBP EB病毒(HBP Epstein Barr virus)、牛痘病毒载体及胜利基森林病毒(Semliki Forest virus;SFV)的载体。参见Brent等人,见上文;Smith,Annu.Rev.Microbiol.49:807,1995;及Rosenfeld等人,Cell 68:143,1992。

[0183] 表达载体的选择视欲表达载体的预定宿主细胞而定。通常,表达载体含有可操作地连接于编码TSLP结合抗体链抗原结合片段的多核苷酸的启动子及其他调节序列(例如增强子)。在一个实施方案中,诱导型启动子用于防止插入序列表达,诱导条件下除外。诱导型启动子包括例如阿拉伯糖、lacZ、金属硫蛋白启动子或热休克启动子。经转化的生物体培养物可在非诱导条件下扩增,而群体不偏向表达产物被宿主细胞良好耐受的编码序列。除启动子外,其他调节组件还可为TSLP结合抗体链或抗原结合片段的有效表达所必需或需要的。这些组件通常包括ATG起始密码子及相邻的核糖体结合位点或其他序列。另外,表达效率可通过在使用中包涵对细胞系统合适的增强子来增强(参见例如Scharf等人,Results Probl.Cell Differ.20:125,1994;及Bittner等人,Meth.Enzymol.,153:516,1987)。举例而言,SV40增强子或CMV增强子可用于提高哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0184] 表达载体还可提供分泌信号序列位置以与由所插入的TSLP结合抗体序列编码的多肽形成融合蛋白。更通常,所插入的TSLP结合抗体序列在包含于载体中之前连接于信号序列。待用于接受编码TSLP结合抗体轻链及重链可变结构域的序列的载体有时还编码恒定区或其部分。此类载体允许可变区与恒定区表达为融合蛋白,从而产生完整抗体及其抗原结合片段。通常,此类恒定区为人恒定区。

[0185] 含有及表达TSLP结合抗体链的宿主细胞可为原核或真核细胞。大肠杆菌为一种适用于克隆及表达本发明多核苷酸的原核宿主。适用的其他微生物宿主包括杆菌(诸如枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)),及其他肠内菌科(诸如沙门氏菌属(*Salmonella*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)),及多种假单胞菌属。在这些原核宿主中,我们还可制备表达载体,其通常含有

与宿主细胞兼容的表达控制序列(例如复制起点)。另外,将存在任何数目的多种熟知启动子,诸如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或来自噬菌体 λ 的启动子系统。启动子通常可选地与操纵序列一起控制表达,且具有用于起始且完成转录及翻译的核糖体结合位点序列等等。诸如酵母的其他微生物还可用于表达本发明的TSLP结合多肽。还可使用昆虫细胞与杆状病毒载体的组合。

[0186] 在一个实施方案中,哺乳动物宿主细胞用于表达及产生本发明的TSLP结合多肽。举例而言,其可为表达内源性免疫球蛋白基因的杂交瘤细胞系(例如,如实例中所述的1D6.C9骨髓瘤杂交瘤克隆)或具有外源性表达载体的哺乳动物细胞系(例如以下例示的SP2/0骨髓瘤细胞)。这些细胞包括任何正常死亡或正常或异常永生动物或人细胞。举例而言,已开发出能够分泌完整免疫球蛋白的多种适合宿主细胞系,包括CHO细胞系、各种Cos细胞系、海拉细胞(HeLa cells)、骨髓瘤细胞系、经转化的B细胞及杂交瘤。使用哺乳动物组织细胞培养物表达多肽大体上论述于例如Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987中。用于哺乳动物宿主细胞的表达载体可包括表达控制序列,诸如复制起点、启动子及增强子(参见例如Queen等人, Immunol. Rev. 89:49-68, 1986), 及必需的处理信息位点(诸如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点), 及转录终止子序列。这些表达载体通常含有来源于哺乳动物基因或来源于哺乳动物病毒的启动子。适合的启动子可为组成型、细胞类型特异性、阶段特异性和/或可调节或可调控的。适用的启动子包括(但不限于)金属硫蛋白启动子、组成型腺病毒主要晚期启动子、地塞米松(dexamethasone)诱导型MMTV启动子、SV40启动子、MRP poIIII启动子、组成型MPSV启动子、四环素(tetracycline)诱导型CMV启动子(诸如人即刻早期CMV启动子)、组成型CMV启动子及本领域中已知的启动子-增强子组合。

[0187] 引入含有感兴趣的多核苷酸序列的表达载体的方法视细胞宿主的类型而变化。举例而言,氯化钙转染通常用于原核细胞,而磷酸钙处理或电穿孔可用于其他细胞宿主。(一般参见Sambrook等人, 见上文)。其他方法包括例如电穿孔、磷酸钙处理、脂质体介导的转化、注射及显微注射、冲击法、病毒体(virosome)、免疫脂质体、聚阳离子:核酸缀合物、裸DNA、人工病毒颗粒(virion)、与疱疹病毒结构蛋白VP22融合(Elliot及O'Hare, Cell 88:223, 1997)、DNA的药物增强性吸收, 及离体转导。为了长期高产率产生重组蛋白质, 将常常需要稳定的表达。举例而言, 稳定表达TSLP结合抗体链或结合片段的细胞系可使用本发明的表达载体制备, 其含有病毒复制起点或内源性表达组件及可选标记基因。在引入载体之后, 在交换至选择性培养基之前, 可使细胞于丰富培养基中生长1-2天。可选标记的目的为赋予抗性以便选择, 且其存在允许成功表达所引入序列的细胞在选择性培养基中生长。经稳定转染的抗性细胞可使用适于该细胞类型的组织培养技术增殖。

抗体及抗体片段的产生

[0188] 单克隆抗体(mAb)可通过多种技术产生, 包括现有单克隆抗体方法, 例如Kohler及Milstein, 1975 Nature 256:495的标准体细胞杂交技术。可采用产生单克隆抗体的许多技术例如B淋巴细胞的病毒或致癌转化。

[0189] 用于制备杂交瘤的动物系统为鼠系统。小鼠中的杂交瘤产生为沿用已久的程序。免疫方案及分离经免疫的脾细胞用于融合的技术为本领域中已知。融合伴侣(partner)(例如鼠骨髓瘤细胞)及融合程序也是已知的。

[0190] 在一些实施方案中,本发明的抗体为人源化单克隆抗体。本发明的嵌合或人源化抗体及其抗原结合片段可基于如上所述制备的鼠单克隆抗体的序列制备。编码重链及轻链免疫球蛋白的DNA可自感兴趣的鼠杂交瘤获得且使用标准分子生物学技术进行工程改造以含有非鼠(例如人)免疫球蛋白序列。举例而言,为产生嵌合抗体,可使用本领域中已知的方法使鼠可变区连接于人恒定区(参见例如Cabilly等人的美国专利第4,816,567号)。为产生人源化抗体,可使用本领域中已知的方法将鼠CDR区插入人框架中。参见例如Winter的美国专利第5,225,539号及Queen等人的美国专利第5,530,101号、第5,585,089号、第5,693,762号及第6180370号。

[0191] 在一些实施方案中,本发明的抗体为人单克隆抗体。此类针对TSLP的人单克隆抗体可使用携带部分人免疫系统而非小鼠系统的转基因或转染色体小鼠来产生。这些转基因及转染色体小鼠包括在本文中分别称为HuMAb小鼠及KM小鼠的小鼠且在本文中统称为“人Ig小鼠”。

[0192] HuMAb**Mouse**® (Medarex, Inc.) 含有编码未重排人重链(μ 及 γ)及 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因微型基因座以及使内源性 μ 及 κ 链基因座失活的靶向突变(参见例如Lonberg等人,1994Nature 368 (6474):856-859)。因此,小鼠展现小鼠IgM或K表达减少,且响应于免疫,所引入的人重链及轻链转基因经历类别转换及体细胞突变以产生高亲和力人IgG- κ 单克隆(Lonberg, N. 等人,1994见上文;综述于Lonberg, N., 1994Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. 及Huszar, D., 1995Intern. Rev. Immunol. 13:65-93; 及Harding, F. 及Lonberg, N., 1995Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546中)。HuMAb小鼠的制备及用途及由此类小鼠携带的基因组修饰进一步描述于Taylor, L. 等人,1992Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. 等人,1993International Immunology 5:647-656; Tuailon等人,1993Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724; Choi等人,1993Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. 等人,1993EMBO J. 12:821-830; Tuailon等人,1994J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. 等人,1994International Immunology 579-591; 及Fishwild, D. 等人,1996Nature Biotechnology 14:845-851,以上所有的内容皆以全文引用的方式专门并入本文中。此外参见美国专利第5,545,806号、第5,569,825号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,789,650号、第5,877,397号、第5,661,016号、第5,814,318号、第5,874,299号及第5,770,429号(皆颁予Lonberg及Kay); 美国专利第5,545,807号(颁予Surani等人); PCT公开第W0 92103918号、第W0 93/12227号、第W0 94/25585号、第W0 97113852号、第W0 98/24884号及第W0 99/45962号(皆颁予Lonberg及Kay); 及PCT公开第W0 01/14424号(颁予Korman等人)。

[0193] 在一些实施方案中,人抗体可使用在转基因及转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠(诸如携带人重链转基因及人轻链转染色体的小鼠)来产生。此类小鼠(在本文中称为“KM小鼠”)详细描述于Ishida等人的PCT公开W0 02/43478中。

[0194] 再者,表达人免疫球蛋白基因的替代转基因动物系统在本领域中可获得,且可用于产生TSLP结合抗体及其抗原结合片段。举例而言,可使用称为Xenomouse (Abgenix, Inc.) 的替代转基因系统。此类小鼠描述于例如Kucherlapati等人的美国专利第5,939,598号、第6,075,181号、第6,114,598号、第6,150,584号及第6,162,963号。

[0195] 另外,表达人免疫球蛋白基因的替代转染色体动物系统可在本领域中获得,且可用于产生本发明的TSLP结合抗体。举例而言,可使用称为“TC小鼠”的携带人重链转染色体及人轻链转染色体的小鼠;此类小鼠描述于Tomizuka等人,2000Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:722-727中。此外,携带人重链及轻链转染色体的牛已描述于本领域中(Kuroiwa等人,2002Nature Biotechnology 20:889-894),且可用于产生本发明的TSLP结合抗体。

[0196] 人单克隆抗体还可使用筛选人免疫球蛋白基因文库的噬菌体展示方法来制备。分离人抗体的此类噬菌体展示方法在本领域中已确立或描述于下文实例中。参见例如:Ladner等人的美国专利第5,223,409号、第5,403,484号及第5,571,698号;Dower等人的美国专利第5,427,908号及第5,580,717号;McCafferty等人的美国专利第5,969,108号及第6,172,197号;及Griffiths等人的美国专利第5,885,793号、第6,521,404号、第6,544,731号、第6,555,313号、第6,582,915号及第6,593,081号。

[0197] 本发明的人单克隆抗体还可使用人免疫细胞已重建于其中以使得免疫接种时可产生人抗体反应的SCID小鼠来制备。此类小鼠描述于例如Wilson等人的美国专利第5,476,996号及第5,698,767号中。

[0198] 抗体Fab片段或Fab可通过用木瓜蛋白酶消化单克隆抗体且随后通过亲和色谱法纯化来产生。Fab还可通过如上所述使用编码Fab的核酸以重组方式合成产生。Fab片段可保留完全IgG分子的结合特异性和/或活性,但具有较小尺寸且具有较低分子量,使其可适用于与完全IgG分子不同的应用。

框架或Fc工程改造

[0199] 本发明的经工程改造的抗体及其抗原结合片段包括其中已对VH和/或VL内的框架残基进行修饰,例如以改善抗体特性的抗体及其抗原结合片段。通常进行此类框架修饰以降低抗体的免疫原性。举例而言,一种方法为使一个或多个框架残基“回复突变”成相应胚系序列。更特定而言,已经历体细胞突变的抗体可含有不同于抗体所来源的胚系序列的框架残基。此类残基可通过比较抗体框架序列与抗体所来源的胚系序列来鉴别。为使框架区序列返回其胚系构型,体细胞突变可通过例如定点诱变“回复突变”成胚系序列。本发明还意欲涵盖此类“回复突变”抗体。

[0200] 框架修饰的另一类型包括使框架区内或甚至一个或多个CDR区内的一个或多个残基突变,以移除T细胞表位,由此降低抗体的潜在免疫原性。此方法还称为“去免疫”,且进一步详细描述于Carr等人的美国专利公开第20030153043号中。

[0201] 除框架或CDR区内所作的修饰之外或可替代地,本发明的抗体可经工程改造以包括Fc区内的修饰,通常以改变抗体的一种或多种功能特性,诸如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。此外,本发明的抗体可经化学修饰(例如可将一个或多个化学部分附接于抗体上)或经修饰以改变其糖基化,从而再改变抗体的一种或多种功能特性。这些实施方案中的每一个进一步详细描述于下文中。Fc区中的残基编号为Kabat EU索引编号。

[0202] 在一个实施方案中,CH1的铰链区经修饰以使得铰链区中半胱氨酸残基的数目改变,例如增加或减少。此方法进一步描述于Bodmer等人的美国专利第5,677,425号中。CH1铰链区中的半胱氨酸残基数经改变以例如促进轻链及重链的组装或提高或降低抗体的稳定性。

[0203] 在另一实施方案中,抗体的Fc铰链区经突变以降低抗体的生物半衰期。更特定而言,将一个或多个氨基酸突变引入Fc铰链片段的CH2-CH3结构域界面区中,使得抗体对葡萄球菌蛋白质A (SpA) 的结合相对于原生Fc铰链结构域SpA结合减弱。此方法进一步详细描述于Ward等人的美国专利第6,165,745号中。

[0204] 在另一实施方案中,抗体经修饰以延长其生物半衰期。可进行多种方法。举例而言,可引入以下突变中的一个或多个:T252L、T254S、T256F,如Ward的美国专利第6,277,375号中所述。或者,为延长生物半衰期,抗体可在CH1或CL区内改变以含有获自IgG的Fc区的CH2结构域的两个环的救助受体结合表位,如Presta等人的美国专利第5,869,046号及第6,121,022号中所述。

[0205] 在一个实施方案中,Fc区通过用不同氨基酸残基置换至少一个氨基酸残基来改变,以改变抗体的效应功能。举例而言,一个或多个氨基酸可经不同氨基酸残基置换以使得抗体具有改变的针对效应子配体的亲和力、但保留亲本抗体的抗原结合能力。亲和力改变的效应子配体可为例如Fc受体或补体的C1组分。此方法进一步详细描述于例如Winter等人的美国专利第5,624,821号及第5,648,260号中。

[0206] 在另一实施方案中,选自氨基酸残基的一个或多个氨基酸可经不同氨基酸残基置换,以使得抗体具有改变的C1q结合和/或降低或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。此方法进一步详细描述于Idusogie等人的美国专利第6,194,551号中。

[0207] 在另一实施方案中,一个或多个氨基酸残基经改变以由此改变抗体固定补体的能力。此方法进一步描述于Bodmer等人的PCT公开W0 94/29351中。

[0208] 在另一实施方案中,Fc区通过修饰一个或多个氨基酸而经修饰以提高抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或提高抗体对Fc γ 受体的亲和力。此方法进一步描述于Presta的PCT公开W0 00/42072中。此外,已定位人IgG1对Fc γ RI、Fc γ RII、Fc γ RIII及Fc γ Rn的结合位点且已描述结合改进的变体(参见Shields,R.L.等人,2001J.Biol.Chem.276:6591-6604)。

[0209] 在另一实施方案中,抗体的糖基化经修饰。举例而言,可产生去糖基化抗体(即,缺乏糖基化的抗体)。糖基化可经改变以例如提高抗体对抗原的亲和力。此类碳水化合物修饰可通过例如改变抗体序列内的一个或多个糖基化位点来实现。举例而言,可进行一个或多个氨基酸取代,以消除一个或多个可变区框架糖基化位点,由此消除该位点的糖基化。此类去糖基化可提高抗体对抗原的亲和力。此类方法进一步详细描述于Co等人的美国专利第5,714,350号及第6,350,861号中。

[0210] 另外或替代地,可产生糖基化类型改变的抗体,诸如海藻糖基残基量减少的低海藻糖基化抗体或二分G1cNac结构增加的抗体。此类经改变的糖基化模式已证明会提高抗体的ADCC能力。此类碳水化合物修饰可通过例如在糖基化机制改变的宿主细胞中表达抗体来实现。糖基化机制改变的细胞已描述于本领域中且可用作表达本发明的重组抗体的宿主细胞以由此产生糖基化改变的抗体。举例而言,Hang等人的EP 1,176,195描述一种细胞系,其中编码海藻糖基转移酶的FUT8基因在功能上破坏,使得此类细胞系中所表达的抗体展现低海藻糖基化。Presta的PCT公开W0 03/035835描述一种变体CHO细胞系LecI3细胞,其具有降低的使海藻糖附接于Asn(297)连接的碳水化合物的能力,还使得该宿主细胞中所表达的抗体低海藻糖基化(还参见Shields,R.L.等人,2002J.Biol.Chem.277:26733-26740)。Umana

等人的PCT公开W0 99/54342描述经工程改造以表达糖蛋白修饰型糖基转移酶(例如 β (1,4)-N乙酰基葡萄糖胺转移酶III(GnTIII))的细胞系,使得经工程改造的细胞系内所表达的抗体展现增加的二分GlcNac结构,从而提高抗体的ADCC活性(还参见Umana等人,1999Nat.Biotech.17:176-180)。

工程改造经改变的抗体的方法

[0211] 如上文所论述,本文中展示的具有VH及VL序列或全长重链和轻链序列的TSLP结合抗体可用于通过修饰全长重链和/或轻链序列、VH和/或VL序列或附接于其的恒定区来产生新TSLP结合抗体。因此,在本发明的另一方面,本发明的TSLP结合抗体的结构特征用于形成结构上相关的TSLP结合抗体,其保留本发明的抗体及其抗原结合片段的至少一种功能特性,诸如结合于人TSLP。

[0212] 举例而言,如上文所论述,本发明的抗体及其抗原结合片段的一个或多个CDR区或其突变可以重组方式与已知的框架区和/或其他CDR组合,以产生其他经重组工程改造的本发明的TSLP结合抗体及其抗原结合片段。其他修饰类型包括先前部分中所述的修饰。用于工程改造方法的起始物质为本文所提供的VH和/或VL序列中的一个或多个,或其一个或多个CDR区。为产生经工程改造的抗体,不必实际上制备(即以蛋白质形式表达)具有本文所提供的VH和/或VL序列中的一个或多个或其一个或多个CDR区的抗体。确切而言,序列中所含的信息用作起始物质以产生来源于原始序列的“第二代”序列,且随后制备“第二代”序列且表达为蛋白质。

[0213] 经改变的抗体序列还可通过筛选具有固定CDR3序列或如US20050255552中所述的最少必需结合决定簇及CDR1与CDR2序列的多样性的抗体文库来制备。筛选可根据适于自抗体文库筛选抗体的任何筛选技术(诸如噬菌体展示技术)进行。

[0214] 可使用标准分子生物学技术制备及表达经改变的抗体序列。由经改变的抗体序列编码的抗体为保留本文所述的TSLP结合抗体的一个、一些或全部功能特性的抗体,所述功能特性包括(但不限于)特异性结合于人TSLP蛋白质且使其稳定。

[0215] 经改变的抗体的功能特性可使用本领域中可获得和/或本文所述的标准分析(诸如阐述于实例中的分析(例如ELISA))评定。

[0216] 在一些实施方案中,工程改造本发明的抗体及其抗原结合片段的方法,可沿着TSLP结合抗体编码序列的全部或部分随机或选择性引入突变且可针对结合活性和/或如本文所述的其他功能特性筛选所得经修饰的TSLP结合抗体。突变方法已描述于本领域中。举例而言,Short的PCT公开W0 02/092780描述使用饱和诱变、合成连接组装或其组合来产生及筛选抗体突变的方法。或者,Lazar等人的PCT公开W0 03/074679描述使用计算机筛选方法使抗体的生理化学特性优化的方法。

本发明的抗体的表征

[0217] 本发明的抗体及其抗原结合片段可通过多种功能分析来表征。举例而言,其可通过其结合TSLP及抑制TSLP活性的能力来表征。

[0218] 抗体结合于TSLP的能力可通过直接标记感兴趣的抗体来检测,或抗体可未标记且使用本领域中已知的各种夹心分析格式间接检测结合。

[0219] 在一些实施方案中,本发明的TSLP结合抗体及其抗原结合片段阻断参考TSLP结合抗体与TSLP多肽的结合或与其竞争。这些抗体可为上文所述的全人或人源化TSLP结合抗

体。其还可为与参考抗体结合于相同表位的其他人、小鼠、嵌合或人源化TSLP结合抗体。阻断参考抗体结合或与参考抗体竞争结合的能力表明测试的TSLP结合抗体结合于与参考抗体所界定的相同或类似的表位,或结合于足够靠近参考TSLP结合抗体所结合的表位的表位。此类抗体尤其可共享针对参考抗体所鉴别的有利特性。阻断参考抗体或与参考抗体竞争的能力可通过例如竞争结合分析测定。使用竞争结合分析,检验测试抗体抑制参考抗体与诸如TSLP多肽的共同抗原特异性结合的能力。若过量测试抗体基本上抑制参考抗体结合,则测试抗体与参考抗体竞争特异性结合于抗原。基本上抑制意指测试抗体通常至少10%、25%、50%、75%或90%降低参考抗体的特异性结合。

[0220] 存在多种已知竞争结合分析可用以评定抗体与参考抗体竞争结合于特定蛋白质(在此情况下,TSLP)。这些分析包括例如固相直接或间接放射免疫分析(RIA)、固相直接或间接酶免疫分析(EIA)、夹心竞争分析(参见Stahli等人,Methods in Enzymology 9:242-253,1983);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见Kirkland等人,J.Immunol.137:3614-3619,1986);固相直接标记分析、固相直接标记夹心分析(参见Harlow及Lane,见上文);使用I-125标记的固相直接标记RIA(参见Morel等人,Molec.Immunol.25:7-15,1988);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(Cheung等人,Virology 176:546-552,1990);以及直接标记RIA(Moldenhauer等人,Scand.J.Immunol.32:77-82,1990)。通常,此类分析涉及使用结合于携有未经标记的测试TSLP结合抗体及经标记的参考抗体中任一者的固体表面或细胞的经纯化抗原。竞争性抑制通过在测试抗体存在下测定结合于固体表面或细胞的标记的量来测量。通常测试抗体过量存在。通过竞争分析(竞争抗体)鉴别的抗体包括与参考抗体结合于相同表位的抗体及结合于足够靠近参考抗体所结合的表位的相邻表位以发生位阻的抗体。

[0221] 为确定所选TSLP结合单克隆抗体是否结合于独特表位,可使用市售试剂(例如来自Pierce,Rockford,Ill的试剂)对各抗体进行生物素化。使用未标记的单克隆抗体及经生物素化的单克隆抗体的竞争研究可使用TSLP多肽包被的ELISA板进行。经生物素化的MAb结合可用链霉素-抗生物素蛋白-碱性磷酸酶探针检测。为确定经纯化的TSLP结合抗体的同种型,可进行同种型ELISA。举例而言,在4℃下可将微量滴定板的孔包被以1μg/ml抗人IgG过夜。在用1%BSA封闭之后,板与1μg/ml或小于1μg/ml的单克隆TSLP结合抗体或经纯化的同种型对照在环境温度下反应一至两小时。接着可使孔与人IgG1或人IgM特异性碱性磷酸酶缀合的探针反应。接着使板显影且分析,从而可确定经纯化的抗体的同种型。

[0222] 为证实单克隆TSLP结合抗体与表达TSLP多肽的活细胞的结合,可使用流式细胞术。简言之,表达TSLP的细胞系(在标准生长条件下生长)可与各种浓度的TSLP结合抗体在含有0.1%BSA及10%胎牛血清的PBS中混合,且在37℃下孵育1小时。在洗涤之后,使细胞与荧光素标记的抗人IgG抗体在与初级抗体染色相同的条件下反应。样品可通过FACScan仪器分析,使用光及侧散射特性对单细胞进行闸控。除流式细胞术分析之外或代替流式细胞术分析,可使用荧光显微法的替代性分析。细胞可如上所述准确染色且通过荧光显微法检验。此方法允许目测个别细胞,但可具有降低的灵敏度,视抗原密度而定。

[0223] 可通过蛋白质印迹法进一步测试本发明的TSLP结合抗体及其抗原结合片段与TSLP多肽或抗原片段的反应性。简言之,可制备经纯化的TSLP多肽或融合蛋白或来自表达TSLP的细胞的细胞提取物且进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。在电泳之后,将经

分离的抗原转移至硝化纤维素膜,用10%胎牛血清封闭,且用待测试的单克隆抗体探测。可使用抗人IgG碱性磷酸酶检测人IgG结合且用BCIP/NBT底物片剂(Sigma Chem.Co., St.Louis,Mo.)显影。

[0224] 功能分析的实例还描述以下实施例部分中。

药物组合物及制剂

[0225] 本文还提供组合物,例如药物组合物,其包含一种或多种特异性结合TSLP的分子(例如抗体、抗体片段,诸如Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、微型抗体或双抗体)作为活性成分。

[0226] 药物组合物通常包括药学上可接受的赋形剂。药学上可接受的赋形剂可包括与药物施用相容的生理盐水、溶剂、分散介质、包衣、抗细菌及抗真菌剂、等张及吸收延迟剂等等。药物组合物通常配制成与其预定施用途径兼容。举例而言,对于通过吸入施用,化合物可以气溶胶喷雾形式自含有适合推进剂(例如气体,诸如二氧化碳)的加压容器或分配器或喷雾器递送。此类方法包括美国专利第6,468,798号中所述的方法。

[0227] 在一些实施方案中,本文所提供的药物组合物经配制用于靶向递送至受试者的呼吸道,尤其受试者的肺。此类制剂可避免活性成分沉积于受试者的上呼吸道中,由此使与药物沉积于口腔及咽喉相关联的耐受性或安全性问题减至最少。在一些实施方案中,本文所提供的药物组合物配制为干粉制剂。此类干粉制剂可包括活性成分、壳形成赋形剂、玻璃形成赋形剂及缓冲液。

活性成分

[0228] 干粉制剂的活性成分可包括如本文所述的抗TSLP抗体及抗体片段中的一个或多个。

[0229] 可调节药物制剂中活性成分的量以便每一单位剂量递送治疗有效量的活性成分,从而达成所需结果。实际上,此将视特定成分、其活性、待治疗病症的严重程度、患者群体、给药要求、所需治疗作用及组合物中所含的添加剂的相对量而大幅改变。组合物将一般含有约1重量%至约99重量%的活性成分,例如约5重量%至约95重量%、约10重量%至约90重量%、约15重量%至85重量%、约20重量%至80重量%、约25重量%至75重量%、约30重量%至70重量%、约40重量%至60重量%或约50重量%的活性成分。本发明的组合物特别适用于以0.001毫克/天至100毫克/天的剂量,优选以0.01毫克/天至75毫克/天的剂量且更优选以0.10毫克/天至50毫克/天的剂量递送活性成分。应理解,多于一种的活性成分可并入本文所述的制剂中,使用术语“活性成分”决不排除使用两种或多于两种此类活性成分。

赋形剂

[0230] 在一些实施方案中,本文所述的干粉制剂含有药学上可接受的疏水性壳形成赋形剂。壳形成赋形剂为增强喷雾干粉的分散性的表面活性剂。疏水性壳形成赋形剂可采用多种形式,其将至少在一定程度上取决于组合物及干粉制剂的既定用途。适合的药学上可接受的疏水性赋形剂可一般选自长链磷脂、疏水性氨基酸及肽及长链脂肪酸皂。

[0231] 在一些实施方案中,壳形成赋形剂包括:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、三亮氨酸、二亮氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、二棕榈酰基磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰基磷脂酰胆碱(DSPC)及硬脂酸镁。在一些实施方案中,本文所述的干粉制剂包括三亮氨酸。

[0232] 通过控制制剂及方法,喷雾干燥颗粒的表面可主要由壳形成赋形剂构成。表面浓

度可大于70%，诸如大于75%或80%或85%。在一些实施方案中，表面由大于90%壳形成赋形剂、或大于95%或98%或99%疏水性赋形剂构成。对于有效活性成分，表面由大于95%壳形成赋形剂构成并非不常见的。

[0233] 在一些实施方案中，如通过化学分析用电子能谱术 (ESCA, 还称为X射线光电子光谱或XPS) 所测量，壳形成赋形剂包含大于70%颗粒界面，优选大于90%或95%。

[0234] 在一些实施方案中，壳形成赋形剂有助于皱颗粒形态的出现。此意指颗粒形态为多孔、起皱、波纹或有折痕而非光滑的。此意指可吸入药物颗粒的内表面和/或外表面至少部分为皱的。此皱度通过改进粉末流体化及分散性而适用于提供高递送效率、剂量同一性及药物靶向。颗粒皱度增加导致颗粒间凝聚力降低，因为颗粒不能接近于范德华接触内。凝聚力降低足以显著改进皱颗粒总体 (ensemble) 中的粉末流体化及分散性。

[0235] 若存在，则壳形成赋形剂的含量一般介于约15至50%w/w药物范围内。对于三亮氨酸，制剂中最少需要约15%以提供作为壳形成剂可接受的效能。对于亮氨酸，最小所需含量较高，约30%。

[0236] 诸如三亮氨酸的疏水性壳形成赋形剂的使用可受其在液体原料中的溶解度限制。通常，经工程改造的粉末中的三亮氨酸含量小于30%w/w，更常常为约10%w/w至20%w/w (约10-30%w/w)。由于其有限的水溶性及其表面活性，故三亮氨酸为极好的壳形成剂。亮氨酸也可用作壳形成赋形剂且本发明的实施方案可包含亮氨酸浓度为约50%至75%的颗粒。

[0237] 脂肪酸皂行为类似于亮氨酸及三亮氨酸，因此为适合的表面调节剂。

[0238] 由于干燥事件的时间标度短，故溶解于原料中的活性成分将一般以非晶形固体形式存在于喷雾干燥药品中。

[0239] 在与其晶体对应体相比时非晶形固体的分子运动性为显著的。分子运动性包含与分子扩散相关的长程运动以及诸如键旋转的局部运动。非晶形材料的固态稳定的中心原理为分子运动性产生不合需要的物理及化学变化。因此，非晶形材料的配制策略通常集中于抑制分子运动性。

[0240] 分子运动性与不稳定性之间存在关联为直观且众所周知的。然而，为了使用，分子运动性必须依据所存在的运动类型加以谨慎定义及理解。长程分子运动由称为 α -弛豫的结构弛豫引起。此类运动的时间标度随着温度降低至低于玻璃化温度 (T_g) 而明显增加，或相反地，在固定观察温度下随着 T_g 升高而明显增加。由于玻璃中分子的稳定限制其长程分子运动性，故此已变成最常见的非晶形药物的固态稳定配制策略。

[0241] 在固态中分子运动性的玻璃态稳定控制 (诸如通过使用玻璃形成剂) 可改进制剂中蛋白质的物理化学稳定性。当需要玻璃形成剂时，多个考虑因素将支配其选择。玻璃形成赋形剂的主要作用为减少药物的总体长程分子运动性。实际上，此通过升高含有药物的非晶相的玻璃化温度来实现。虽然具有高 T_g 值的赋形剂一般为所需的，但即使具有中等 T_g 的赋形剂仍可能适用于一些制剂 (例如，具有中等 T_g 的药物或若制剂中的药物浓度低)。为了指导配制者，值得强调理想玻璃形成剂的特性：具有高玻璃化温度的生物兼容性材料，其可与药物混溶，从而形成仅由水微弱塑化的单个非晶相。

[0242] 在一些实施方案中，本文所述的干粉制剂含有玻璃形成赋形剂。抑制长程分子运动性的玻璃形成赋形剂包括碳水化合物、氨基酸及缓冲液。在一些实施方案中，玻璃形成赋形剂包括：组氨酸、组氨酸HCl、蔗糖、海藻糖、甘露醇及柠檬酸钠。因此，一些赋形剂 (诸如组

氨酸)可互换地称为缓冲液或玻璃形成赋形剂。在一些实施方案中,本文所述的干粉制剂(例如核壳制剂)包括海藻糖。

[0243] 其他类型的分子运动的重要性已在药物文献中变得愈来愈受认可。用于标明分子运动类型的命名法(α 、 β 等)起源于宽频介电谱。介电弛豫谱现有在频率标度上标绘。当解译这些谱时,在最低频率下的介电损耗峰称为 α 运动,较高频率运动称为 β 运动,接着 γ ,以此类推。因此, β 及在较高频率下存在的其他运动称为“快速”或二级运动(且在一些情况下,乔哈里-戈德斯坦弛豫(Johari-Goldstein relaxation))。虽然这些二级弛豫常常归属于不同分子部分(例如蛋白质上的侧链)的分子内运动,但即使刚性分子仍存在这些二级弛豫。在极简物理图像中, β 运动有时描述为截留在最近相邻者当中的物质的随机“笼型颤动”。在一些点处,最近相邻者的局部运动提供足以使得截留物质扩散跳跃的自由体积。此为 α 运动。因此, β 运动引起 α 运动。

[0244] 二级运动为出于理论及实际观点的活跃研究领域。并且,虽然大量文献涉及冻干或熔融-淬灭玻璃,但原理还与经工程改造以用于吸入的非晶形颗粒(例如使用喷雾干燥或某些其他由下而上方法制备的粉末)有关。接近 T_g 的小分子结晶已疑似由 β 运动引起。蛋白质配制者已认识到控制这些 β 运动的重要性。通常,使用少量有机赋形剂(诸如甘油、甘露醇、山梨醇及二甲亚砷)进行非晶形制剂中 β 运动的抑制。虽然这些赋形剂为最常报导的抑制 β 运动的赋形剂,但其他低MW有机分子还可提供此目的(例如缓冲盐或相对离子)。假设这些赋形剂通过升高局部黏度而抑制高运动性结构域的运动。对于熟悉关于玻璃态稳定的大量文献的读者,使用此类赋形剂似乎违反直觉。这些及大部分其他低分子量材料具有低 T_g 值且将减小制剂的 T_g ,其为一种称为塑化的现象。然而,这些赋形剂还可削弱 β 运动。因此,其称为反塑化剂或有时称为塑化剂,视参考点而定;虽然其使 α 运动塑化,但其使 β 运动反塑化。注意,此术语为文献中可能的混淆来源;材料称为塑化剂或反塑化剂视我们的参考点是否为 α 或二级运动而定。

[0245] 由于蛋白质的固态稳定需要配制玻璃态基质,故 α 及 β 运动的作用尤其受关注。虽然文献已大量提及使用玻璃形成剂稳定蛋白质,但直至近来,仍极少专门提及这些试剂对局部运动的影响。虽然蛋白质的玻璃化温度难以测量,但大部分数据表明 $T_g > 150^\circ\text{C}$ 。因此,最常用于稳定蛋白质的赋形剂(例如双糖,诸如蔗糖或海藻糖)还将使蛋白质中的 α 运动塑化(及使二级运动反塑化)。最新研究已证明 β 运动主要支配糖玻璃中蛋白质的稳定性。因此,双糖使蛋白质制剂中的 β 运动反塑化。

[0246] 在一些实施方案中,本文所述的干粉制剂包含具有高玻璃化温度($>80^\circ\text{C}$)的玻璃形成赋形剂。在一些实施方案中,本文所述的干粉制剂包含玻璃形成剂,诸如蔗糖、海藻糖、甘露醇、反丁烯二酰基二酮哌嗪及柠檬酸钠。

[0247] 玻璃形成剂的混合物可用于达成非晶形固体的最佳稳定。对于“平台”核壳制剂,在一些实施方案中使用海藻糖及甘露醇的混合物。

[0248] 为达成抑制分子运动性及达成物理及化学稳定性所需的玻璃形成剂的量将视活性剂的性质而定。对于具有喷雾干燥蛋白质的一些实施方案,玻璃形成剂与蛋白质的摩尔比可在300至900范围内。对于小分子,玻璃形成剂的所需量将视活性剂的 T_g 而定。

[0249] 在一些实施方案中,本文所述的干粉制剂含有缓冲液。缓冲液已熟知用于控制pH,作为在生理学兼容的pH下递送药物的手段(即以改进耐受性)以及提供有利于药物的化学

稳定性的溶液条件。在本文所述的一些制剂及方法中,药物的pH环境可通过将药物及缓冲液一起共配制于同一颗粒中来控制。

[0250] 虽然很自然地地质疑固态药品中pH的意义,但许多研究已证明pH控制对于固态化学稳定性的重要性。水为普遍存在的,即使在固态“干燥”粉末制剂中。除了作为非晶形材料的塑化剂的作用以外,水为反应物、降解产物且还可充当溶解及化学反应的介质。有迹象表明水吸附于颗粒表面上可在表面膜内产生饱和溶液。实际上,一些研究已使用药物浆液(即饱和溶液)的pH作为溶解于“干燥”粉末的表面膜中的药物的局部或“微环境”pH的指标。在一些情况下,已显示微环境pH与药物的稳定性有关。

[0251] 如同药物一样,赋形剂也溶解于吸附水的表面膜中以形成饱和溶液。此可用于配制者能够控制水分吸附层的局部pH的优势。缓冲液或pH调节剂(诸如组氨酸或磷酸盐)常用于冻干或喷雾干燥制剂以控制蛋白质的溶液及固态化学降解。

[0252] 在一些实施方案中,用于制剂的缓冲液包括:组氨酸、甘氨酸、乙酸盐及磷酸盐。

[0253] 可选的赋形剂包括盐(例如氯化钠、氯化钙、柠檬酸钠)、抗氧化剂(例如甲硫氨酸)、减少溶液中蛋白质聚集的赋形剂(例如精氨酸)、遮味剂及设计成改进大分子吸收于体循环中的试剂(例如反丁烯二酰基二酮哌嗪)。

制剂

[0254] 本文提供干粉制剂,其包含有效避免沉积于普通成年受试者的口咽的喷雾干燥颗粒,使得能够靶向递送药物至肺中。

[0255] 在一些实施方案中,本文所述的干粉制剂的颗粒具有标称剂量的80至95%w/w之间的体外总肺剂量(TLD),例如对于普通成年受试者,在85至90%w/w之间。

[0256] 在一些实施方案中,本文所述的干粉制剂的颗粒具有递送剂量的90至100%w/w之间的体外总肺剂量(TLD),例如对于普通成年受试者,在90至95%w/w之间。

[0257] 在一些实施方案中,本文所述的干粉制剂包含适当具有在120至400 μm^2 L/min之间,例如在150至300 μm^2 L/min之间的惯性参数的递送剂量。

[0258] 在一些实施方案中,本文所述的干粉制剂包含经工程改造的包含多孔、波纹或皱表面的颗粒。此类颗粒与具有可比初始粒度的微粒化药物晶体相比展现减小的颗粒间凝聚力。此使得粉末流体化及分散性相对于微粒化药物与粗乳糖的有序混合物得以改进。

[0259] 在一些实施方案中,本文所述的干粉制剂的颗粒的皱度大于1.5,例如1.5至20、3至15或5至10。

[0260] 对于一些活性药物成分,例如许多肽或蛋白质(例如抗TSLP Fab),可通过喷雾干燥净药物而获得皱表面。在此情况下,制剂可包含净药物,即100%w/w活性剂或药物。

[0261] 在一些实施方案中,本文所述的干粉制剂包含药物及缓冲液。该制剂可包含70%至99%w/w药物或活性剂,且剩余部分为缓冲液。

[0262] 在一些实施方案中,本文所述的制剂可包含0.1至99%w/w活性剂、或0.1至70%w/w活性剂、或0.1至50%w/w活性成分、或0.1%至30%w/w活性成分。

[0263] 在一些实施方案中,本文所述的干粉制剂可包括赋形剂以进一步增强制剂的稳定性或生物兼容性。举例而言,涵盖多种盐、缓冲液、抗氧化剂、壳形成赋形剂及玻璃形成赋形剂。

[0264] 在一些实施方案中,本文所述的干粉制剂的颗粒的几何尺寸表示为质量中值直径

(x50), 其在0.8至2.0 μm 之间, 例如在1.0至1.5 μm 之间。

[0265] 在一些实施方案中, 本文所述的干粉制剂的颗粒的几何尺寸表示为x90, 其在2.0 μm 至4.0 μm 之间, 例如在2.5 μm 至3.5 μm 之间。

[0266] 在一些实施方案中, 本文所述的干粉制剂的颗粒的敲紧密度(ρ 敲紧)在0.03至0.40g/cm³之间, 例如在0.07至0.30g/cm³之间。

[0267] 在一些实施方案中, 本文所述的干粉制剂的初始颗粒的计算所得的中值空气动力学尺寸(Da)在0.1至1.0 μm 之间, 例如在0.5至0.8 μm 之间。

[0268] 在一些实施方案中, 本文所述的干粉制剂的颗粒的计算所得的空气动力学直径在0.5至1.2 μm 之间, 例如在0.8至1.0 μm 之间。

[0269] 在一些实施方案中, 以递送剂量存在的本文所述的干粉制剂的颗粒总体的质量中值空气动力学直径(MMAD)适当地介于1.0至3.0 μm 之间, 例如在1.5至2.0 μm 之间。

[0270] 在一些实施方案中, 本发明的制剂含有包含壳及核心的颗粒: 三亮氨酸作为壳形成剂存在于颗粒表面, 核心包含活性成分(例如抗TSLP Fab)、海藻糖或海藻糖与甘露醇的组合及缓冲液。

[0271] 在一些实施方案中, 本发明提供一种制剂, 其包含约40% (w/w) TSLP结合分子(例如抗TSLP Fab1)、约25% (w/w) 三亮氨酸、约30% (w/w) 组合的海藻糖及甘露醇、及约5% (w/w) 组氨酸。在其他实施方案中, 本申请提供一种制剂, 其包含约50% (w/w) TSLP结合分子、约15% (w/w) 三亮氨酸、约2.6% (w/w) HCl、约5.6% (w/w) 组氨酸及约26.8% (w/w) 组合的海藻糖及碱; 或约50% (w/w) TSLP结合分子、约15% (w/w) 三亮氨酸、约19.4% (w/w) 海藻糖、约13% (w/w) 组氨酸及约2.6% (w/w) HCl。

[0272] 在其他实施方案中, 本申请揭示一种无载剂药物粉末组合物, 其包含可由干粉吸入器递送且包含本文所揭示的抗TSLP分子的颗粒, 其中体外总肺剂量大于递送剂量的90%, 且其中递送剂量中的颗粒的惯性参数在120至400 μm^2 L/min之间。

[0273] 在另一实施方案中, 本申请揭示一种可由干粉吸入器递送的无载剂药物组合物, 该组合物包含多个颗粒, 所述颗粒包含具有如本文所揭示的抗TSLP分子及至少一种玻璃形成赋形剂的核心, 及具有疏水性赋形剂及缓冲液的壳; 且其中体外总肺剂量大于递送剂量的90%w/w。在一些实施方案中, 颗粒通过喷雾干燥形成。在另一实施方案中, 疏水性赋形剂包含三亮氨酸。

[0274] 在另一实施方案中, 本申请揭示一种无载剂药物组合物, 其包含可由干粉吸入器递送的多个初始颗粒及颗粒聚结物, 该组合物包含如本文所揭示的抗TSLP分子, 且其中体外总肺剂量(TLD)大于标称剂量的80%, 且其中所述初始颗粒的特征在于: 波纹形态; 中值空气动力学直径(Da)在0.3至1.0 μm 之间; 且其中由干粉吸入器递送的颗粒及颗粒聚结物的质量中值空气动力学直径(MMAD)在1.5至3.0 μm 之间。在一些实施方案中, 药物组合物另外包含含有初始颗粒的容器, 该容器适于在干粉吸入器内雾化之前的颗粒, 且其中在该雾化后形成包含可吸入聚结物的气溶胶。

[0275] 在另一实施方案中, 本申请揭示一种用于经肺递送的药物粉末制剂, 该粉末包含具有1至100重量%如本文所揭示的抗TSLP分子的颗粒, 其中该粉末的特征在于至少50%的1至1.5微米之间的粒度分布, 或0.05至0.3g/cm³的粉末密度, 小于2微米的空气动力学直径, 1.5至20的皱度; 且其中该粉末通过吸入施用, 且提供大于80%的体外总肺剂量。在一些

实施方案中,药物粉末制剂为无载剂的。在其他实施方案中,粉末封装在与干粉吸入器一起使用的容器中,且其中当使用该干粉吸入器雾化时,粉末的特征在于具有质量中值空气动力学直径小于约2微米的可吸入聚结物。

方法

[0276] 本文还提供用于制备包含喷雾干燥颗粒的用于吸入的干粉制剂的方法,该制剂含有至少一种活性成分,且体外总肺剂量(TLD)对于普通成年受试者为标称剂量的80至95% w/w之间,例如在85至90% w/w之间。

[0277] 本文还提供用于制备包含喷雾干燥颗粒的用于吸入的干粉制剂的方法,该制剂含有至少一种活性成分,且体外总肺剂量(TLD)对于普通成年受试者为递送剂量的90至100% w/w之间,例如在90至95% w/w之间。

[0278] 在一些实施方案中,干粉制剂含有至少一种适于治疗阻塞性或炎性气道疾病(尤其哮喘和/或COPD)的活性成分,例如抗TSLP Fab。在一些实施方案中,干粉制剂含有至少一种适于以体循环非侵入性治疗疾病的活性成分。

[0279] 喷雾干燥在产生经工程改造用于吸入的颗粒时赋予优势,诸如快速产生干粉的能力及控制颗粒属性,包括尺寸、形态、密度及表面组成。干燥方法非常快速(数量级为毫秒)。因此大部分溶解于液相中的活性成分以非晶形固体形式沉淀,因为其不具有充足时间结晶。

[0280] 喷雾干燥包含四个单元操作:原料制备、原料雾化以产生微米尺寸的液滴、在热气体中干燥液滴及用袋滤室或旋风分离器收集干燥颗粒。

[0281] 在一些实施方案中,制备干粉颗粒的方法包含三个步骤,然而,在一些实施方案中,可基本上同时进行这些步骤中的两个或甚至全部三个,因此在实践中,该方法可实际上视为单个步骤方法。仅仅出于描述本发明的方法的目的,将分别描述三个步骤,但此类描述不意欲局限于三步骤方法。

[0282] 在一些实施方案中,该方法包括制备溶液原料及喷雾干燥该原料以提供活性干粉颗粒。原料包含至少一种溶解于水基液体原料中的活性成分。在一些实施方案中,原料包含至少一种溶解于包含所添加的共溶剂的水基原料中的活性成分(例如抗TSLP Fab1)。在一些实施方案中,原料包含至少一种溶解于乙醇/水原料中的活性剂,其中乙醇级分在5%至30% w/w之间,例如在5%至20% w/w之间。

[0283] 对于非晶形固体,重要的是控制药品的水分含量。对于并非水合物的药物,粉末中的水分含量优选小于5%、更通常小于3%或甚至2% w/w。然而,水分含量必须足够高以确保粉末不展现显著的静电吸引力。可通过卡尔费歇尔滴定法(Karl Fischer titrimetry)测定喷雾干粉中的水分含量。

[0284] 在一些实施方案中,将原料喷雾至温热的过滤空气流中以蒸发溶剂且将干燥产物传送到收集器。废气然后与溶剂一起排出。可调节喷雾干燥器的操作条件,诸如入口及出口温度、进料速率、雾化压力、干燥空气的流率及喷嘴构型,以便产生所得干燥颗粒的所需粒度、水分含量及产品产率。适当设备及加工条件的选择在本领域技术人员鉴于本文中教导的范围内且可在无过度实验的情况下实现。**NIRO®PSD-1®**规模干燥器的示例性设定如下:进气口温度在约80℃至约200℃之间,诸如在110℃至170℃之间;出气口在约40℃至约120℃之间,诸如约60℃至100℃之间;液体进料速率在约30g/min至约120g/min之间,诸如约

50g/min至100g/min;总空气流率为约140标准立方英尺/分(scfm)至约230scfm,诸如约160scfm至210scfm;且雾化空气流率在约30scfm至约90scfm之间,诸如约40scfm至80scfm。喷雾干燥原料中的固体含量将通常在0.5%w/v (5mg/ml)至10%w/v (100mg/ml)范围内,诸如1.0%w/v至5.0%w/v。当然设定将视所用设备的规模及类型以及所用溶剂系统的性质而变化。在任何情况下,使用这些及类似方法允许形成具有适合于气溶胶沉积至肺中的直径的颗粒。

[0285] 在一些实施方案中,赋形剂全部溶解于原料中,且分散活性成分上的核壳包衣通过经溶解溶质的物理特性的差异驱动。

[0286] 如先前关于包含非晶形活性成分的颗粒所论述,颗粒表面的性质及形态将通过控制原料内组分的溶解度及扩散率来控制。表面活性疏水性赋形剂(例如三亮氨酸、磷脂、脂肪酸皂)可浓缩在界面处,从而改进粉末流体化及分散性,同时还驱动颗粒的表面粗糙度增加。

[0287] 任何喷雾干燥步骤和/或所有喷雾干燥步骤可使用用于制备用于通过吸入施用的药物中的喷雾干燥颗粒的现有设备来进行。市售喷雾干燥器包括由Büchi Ltd.及Niro Corp制备的喷雾干燥器。

[0288] 在一些实施方案中,原料经双流体喷嘴雾化。液滴的粒度分布显著变宽出现在高于约1.5%w/w的固体负载下。分布尾部的液滴尺寸越大导致相应粉末分布中的颗粒越大。因此,使用双流体喷嘴的一些实施方案将固体负载限定于1.5%w/w或小于1.5%w/w,诸如1.0%w/w或0.75%w/w。

[0289] 在一些实施方案中,可使用如例如美国专利第7,967,221号及第8,616,464号所揭示的平面膜雾化器在较高固体负载下达成窄液滴尺寸分布。在一些实施方案中,原料在2%至10%w/w(诸如3%至5%w/w)的固体负载下雾化。

[0290] 在一些实施方案中,颗粒群体密度或PPD在 0.01×10^{-6} 至 1.0×10^{-6} 之间,诸如在 0.03×10^{-6} 至 0.2×10^{-6} 之间。

[0291] 在一些实施方案中,EtOH/固体比率在1.0至20.0之间,诸如在3.0至10.0之间。

[0292] 在一些实施方案中,本申请揭示一种用于吸入的药物粉末制剂,其包含通过包含以下步骤的方法制备的颗粒:

a. 制备本文所揭示的抗TSLP结合分子于水/乙醇混合物中的溶液,其中存在1至20%的乙醇且乙醇与总固体的比率在1至20之间;

b. 喷雾干燥该溶液以获得微粒,其中所述微粒的特征在于颗粒密度为0.2g/cm³或低于0.2g/cm³,几何直径为1-3微米且空气动力学直径为1至2微米;

且其中该粉末在通过吸入施用,提供大于约80%的体外总肺剂量。在一些实施方案中,药物粉末制剂另外包括玻璃形成赋形剂。在一些实施方案中,玻璃形成赋形剂包含 α 。在其他实施方案中,玻璃形成赋形剂包含 β 。在另一实施方案中,玻璃形成赋形剂包含海藻糖。

[0293] 在药物粉末制剂的一些实施方案中,颗粒群体密度在 0.01×10^{-6} 至 1.0×10^{-6} 之间。

[0294] 本申请还揭示一种向受试者的肺递送包含干粉的颗粒的方法,该方法包含:

a. 制备本文所揭示的抗TSLP结合分子于水/乙醇混合物中的溶液,其中存在5至

20%的乙醇，

b. 喷雾干燥该溶液以获得微粒，其中所述微粒的特征在于颗粒密度在约0.05至0.3g/cm³之间，几何直径为1-3微米且空气动力学直径为1-2微米；

c. 将该喷雾干粉封装于容器中；

d. 提供具有用于自容器提取粉末的构件的吸入器，该吸入器另外具有粉末流体化及雾化构件，该吸入器可经约2至约6kPa的患者驱动的吸气力操作；该吸入器及粉末一起提供在约120至400μm² L/min之间的惯性参数且其中该粉末在通过吸入施用，提供至少90%肺沉积。

[0295] 本申请还揭示一种制备用于肺递送的干粉药物制剂的方法，该方法包含

a. 制备本文所揭示的抗TSLP结合分子于水/乙醇混合物中的溶液，其中存在5至20%的乙醇，

b. 喷雾干燥该溶液以获得微粒，其中所述微粒的特征在于颗粒密度在约0.05至0.3之间，几何直径为1-3微米且空气动力学直径为1-2微米。

[0296] 在另一实施方案中，本申请揭示一种可由干粉吸入器递送的粉末药物组合物，其包含具有本文所揭示的抗TSLP结合分子的颗粒，其中体外总肺剂量大于递送剂量的90%w/w，且其中该组合物包含至少一个以下特征：无载剂，颗粒密度为0.05至0.3g/cm³；颗粒皱度为3至20；颗粒通过包含喷雾干燥乙醇：水混合物的方法制备；及颗粒通过包含喷雾干燥乙醇：固体的比率在1至20之间的乙醇：水混合物的方法制备。在一些实施方案中，粉末药物组合物包含所述特征中的至少两个；在其他实施方案中，粉末药物组合物包含所述特征中的至少三个。

剂量

[0297] 本文所揭示的抗TSLP分子(包括包含抗TSLP抗体或其片段的药物组合物)的剂量、毒性及治疗功效可通过在细胞培养物或实验动物中的标准药理学程序来测定，例如以测定LD₅₀(50%群体致死的剂量)及ED₅₀(50%群体的治疗有效剂量)。毒性作用与治疗作用之间的剂量比为治疗指数且其可以比率LD₅₀/ED₅₀表示。展现高治疗指数的化合物为所需的。虽然可使用展现毒性副作用的化合物，但应小心设计将此类化合物靶向受影响组织部位的递送系统，以便使对未感染细胞的潜在损害降至最低且由此减少副作用。

[0298] 自细胞培养分析及动物研究获得的数据可用于配制一系列用于人的剂量。此类化合物的剂量优选处于循环浓度的范围内，包括毒性很小或无毒性的ED₅₀。剂量可视所用剂型及所用施用途径而在此范围内变化。对于本发明方法中所用的任何化合物，可自细胞培养分析初步估计治疗有效剂量。可在动物模型中配制剂量以获得如在细胞培养物中所测定的包括IC₅₀(即实现症状的最大半数抑制的测试化合物的浓度)的循环血浆浓度范围。此类信息可用于更准确地判定适用于人的剂量。血浆中的含量可例如通过高效液相色谱法测量。

试剂盒

[0299] 本文还提供试剂盒，其包括本文所提供的药物组合物中的一个或多个、用于向受试者递送该药物组合物的装置及使用说明书。在一些实施方案中，装置可递送呈雾化形式的药物组合物。在一些实施方案中，装置为吸入器，例如干粉吸入器(DPI)。在其他实施方案中，装置可为定剂量吸入器或喷雾器。

[0300] 适合的干粉吸入器包括单位剂量吸入器,其中干粉储存于胶囊或泡壳中,且患者在使用之前将一个或多个胶囊或泡壳负载至装置中。或者,涵盖多剂量干粉吸入器,其中剂量预封装于箔-箔泡壳中,例如药筒、条带或转板中。

[0301] 干粉吸入器包括多剂量干粉吸入器,诸如DISKUS™ (GSK,美国专利6536427中所述)、DISKHALER™ (GSK,专利申请公开WO 97/25086中所述)、GEMINI™ (GSK,专利申请公开WO 05/14089中所述)、GYROHALER™ (Vectura,专利申请公开WO 05/37353中所述)及PROHALER™ (Valois,专利申请公开WO 03/77979中所述)。

[0302] 单剂量干粉吸入器包括AEROLIZER™ (Novartis,US 3991761中所述)及BREEZHALER™ (Novartis,美国专利8479730中所述 (Ziegler等人)。其他适合的单剂量吸入器包括美国专利第8069851号及第7559325号中所述的单剂量吸入器。

[0303] 一些患者发现更容易且更便利使用以递送需要每日施用一次的药物的单位剂量泡壳吸入器包括美国专利第8573197号 (Axford等人)中所述的吸入器。

[0304] 在一些实施方案中,吸入器为多剂量干粉吸入器,其中使粉末流体化及分散的能量由患者供应(即“被动”MD-DPI)。本发明的粉末在低峰吸气流率(PIF)下有效地流体化及分散。因此,观察到在PIF下的粉末分散的小变化有效地平衡在PIF增加所发生的惯性碰撞的增加,从而产生流率非依赖性肺沉积。本发明的粉末所观察到的不存在流率依赖性驱动总体患者间差异性减小。

[0305] 使用说明书可包括关于TSLP相关炎症病症的诊断或治疗的说明书。如本文所提供的试剂盒可根据本文所述的方法中的任一来使用。本领域技术人员应了解本文所提供的试剂盒的其他适合的用途,且应能够将所述试剂盒用于此类用途。如本文所提供的试剂盒还可包括邮件(例如邮资已付的信封或邮递包),其可用以将分析样品传回至例如实验室。试剂盒可包括一个或多个样品容器,或样品可在标准血液采集小瓶中。试剂盒还可包括知情同意书、测试申请表及关于如何在本文所述的方法中使用试剂盒的说明书中的一个或多个。使用此类试剂盒的方法还包括在本文中。一个或多个表格(例如测试申请表)及容纳样品的容器可例如用条形码编码以鉴别提供样品的受试者。

治疗方法

[0306] 本文提供治疗需要治疗的受试者(例如人)的TSLP相关病症的方法,其通过向该受试者施用治疗有效量的本文所述的TSLP结合分子中的任一或其药物组合物。在一些实施方案中,此类方法另外包括鉴别及选择需要治疗TSLP相关炎症病症的受试者。本发明还提供如本文所述的TSLP结合分子或其药物组合物治疗或预防患者的疾病的用途。在一些实施方案中,本发明提供如本文所述的TSLP结合分子或其药物组合物,其用于治疗或预防患者的疾病。在其他实施方案中,本发明提供如本文所述的TSLP结合分子或其药物组合物制备用于治疗或预防患者的疾病的药物的用途。

[0307] 在一些实施方案中,TSLP相关炎症病症可由过敏性反应或环境激惹物或刺激物触发。在一些特定实施方案中,TSLP相关炎症病症包括哮喘、慢性阻塞性肺病、过敏性鼻炎、过敏性鼻炎、过敏性鼻炎、过敏性鼻炎、特应性皮炎、嗜酸性粒细胞性食道炎。

[0308] 在一些实施方案中,TSLP结合分子或包含TSLP结合分子的药物组合物例如通过干粉吸入器以雾化形式通过吸入施用给受试者。在其他实施方案中,TSLP结合分子或药物组合物可使用本领域中已知的多种方法中的一种或多种施用。如本领域技术人员应了解,施

用途径和/或模式将视所需结果而变化。所选施途径包括静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内、皮下、脊髓或其他肠胃外施途径,例如通过注射或输注。肠胃外施用可表示除经肠及局部施用外的通常通过注射的施用模式,包括(但不限于)静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气道、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊椎内、硬膜外及胸骨内注射及输注。或者,本发明的TSLP结合分子或包含TSLP结合分子的药物组合物可通过非肠胃外途径施用,诸如局部、表皮或黏膜施途径,例如鼻内、经口、经阴道、经直肠、舌下或局部。

[0309] 在一些实施方案中,TSLP相关炎症病症为哮喘。哮喘为复杂且异质性的气道慢性炎症性疾病,其特征可逆的支气管收缩且与气道对广泛范围的支气管收缩刺激的放大反应相关联(气道高反应性;AHR)。最新研究已集中于鉴别哮喘发病机制所涉及的免疫路径,且已揭露2型辅助T细胞(Th2)及非Th2介导的效应细胞的作用(Lambrecht及Hammad,Nature immunology 2014,16:45-56)。其特征可逆的嗜酸性粒细胞性炎症及特应反应(atopy)迹象的过敏性哮喘的情况下,Th2免疫路径要素在气道炎症及AHR的出现及维持中至关重要。胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)为Th2反应的关键上游调节因子。TSLP为响应于多种多样的刺激(例如物理损伤、环境微粒物质、过敏原、促炎性或Th2极化细胞因子及微生物产物)而在气道内的黏膜上皮细胞中表达。TSLP的作用为调节树突状细胞(DC)及诱导初始T细胞分化成炎症Th2细胞且作为先天性免疫反应的一部分促使肥大细胞、嗜酸性粒细胞及巨噬细胞分泌细胞因子。另外,TSLP可干扰调节性T细胞出现,损害耐受性与炎症之间的平衡。其特征可逆的嗜中性或粒细胞缺乏性炎症的非过敏性哮喘的情况下,还不被理解为细胞因子驱动的炎症,然而,相信非Th2介导的细胞因子IL-17及干扰素- γ (IFN- γ)均发挥作用。令人关注的是,除在调节Th2反应中的作用以外,临床前证据表明TSLP放大非Th2反应且在建立IL-17及IFN- γ 介导的慢性炎症中也是重要的。

[0310] TSLP对于啮齿动物中出现Th2细胞因子相关的气道炎症为必需且充足的。在表面活性剂蛋白质C启动子控制下具有TSLP的组成型肺上皮细胞分泌的转基因小鼠出现以下与哮喘兼容的特征:嗜酸性粒细胞性气道炎症;表达Th2偏好的CD4⁺ T细胞浸润;全身性嗜酸性粒细胞增多症;IgE增加;气道高反应性;及显著气道重塑,包括杯状细胞增生及气道与血管纤维化。为了进一步支持TSLP在过敏性炎症中的作用,还在吸入的过敏原暴露于肺中之后发现TSLP表达及蛋白质产生增加(Zhou等人,2005,Nature immunology 6,1047-1053),而在抗原存在下直接鼻内递送TSLP导致严重疾病快速发作(Headley等人,2009,Journal of immunology 182,1641-1647)。TSLPR缺陷型小鼠对经典卵白蛋白加矾激活小鼠模型中的Th2样炎症的出现具抗性(Al-Shami等人,2005,The Journal of experimental medicine 202,829-839;Zhou等人,2005,Nature immunology 6,1047-1053)。气道炎症减弱与血清IgE减少及Th2细胞因子及趋化因子(诸如IL-4、-5、-13、嗜酸性粒细胞趋化因子及胸腺及活化调节的趋化因子(TARC))降低相关。

[0311] 在重度哮喘患者中特别观察到气道固有层中的TSLP表达增加(Shikotra等人,2012,Journal of Allergy and Clinical Immunology 129,104-111.e109)。此外,数个研究已显示人TSLP基因座中单核苷酸多态性(SNP)的频率及TSLP表达量与哮喘及嗜酸性粒细胞性食道炎的疾病敏感性之间的关联(Ferreira等人,2014,The Journal of allergy and clinical immunology 133,1564-1571;Harada等人,2011,American journal of

respiratory cell and molecular biology 44,787-793;He等人,2009,The Journal of allergy and clinical immunology 124,222-229;Rothenberg等人,2010,Nature Genetics 42,289-291)。在最新研究中,通过上位性关联还发现TSLP基因变体与儿童哮喘中的哮喘风险显著增加相关联(Biagini Myers等人,2014,The Journal of allergy and clinical immunology 134,891-899e893)。

组合疗法

[0312] 上文所述的各种治疗可与其他治疗伴侣(诸如TSLP相关炎症病症的当前标准护理)组合。因此,本文所述的治疗TSLP相关炎症病症的方法可另外包括向需要治疗的受试者施用第二药物。在一些实施方案中,第二药物可选自(但不限于)皮质类固醇、支气管扩张剂(SABA、LABA、SAMA、LAMA)、抗组织胺、抗白三烯及PDE-4抑制剂。

[0313] 术语“组合”指呈一种剂量单元形式的固定组合或组合施用,其中本发明化合物及组合伴侣(例如,如下文所阐述的另一药物,还称为“治疗剂”或“辅剂”)可同时独立施用或在时间间隔内分开施用,尤其其中这些时间间隔允许组合伴侣显示协作效应,例如协同效应。单个组分可封装在试剂盒中或分开封装。在施用之前组分中的一个或两个(例如,粉末或液体)可重建或稀释至所需剂量。如本文所用的术语“共施用”或“组合施用”等等意欲涵盖向有需要的单个受试者(例如患者)施用所选择的组合伴侣,且意欲包括其中试剂不一定通过相同施用途径或同时施用的治疗方案。如本文所用的术语“药物组合”意指由混合或组合大于一种治疗剂所产生的产物且包括治疗剂的固定及非固定组合。术语“固定组合”意指治疗剂,例如本发明化合物及组合伴侣,均以单个实体或剂量形式同时施用给患者。术语“非固定组合”意指治疗剂,例如本发明化合物及组合伴侣,均以独立实体形式同时、同时或依序施用给患者而无特定时间限制,其中此类施用在患者体内提供治疗有效水平的两种化合物。后者还适用于混合液疗法,例如施用三种或大于三种治疗剂。如本文所用,术语“药物组合”指呈一种单位剂型的固定组合,或用于组合施用的非固定组合或分装部分的试剂盒,其中两种或大于两种治疗剂可同时独立施用或在时间间隔内分开施用,尤其其中这些时间间隔允许组合伴侣显示协作效应,例如协同效应。

[0314] 术语“组合疗法”指施用两种或大于两种治疗剂来治疗本发明中所述的治疗性病症或疾患。此类施用涵盖这些治疗剂以基本上同时的方式,诸如以具有固定比率的活性成分的单个胶囊形式共施用。或者,此类施用涵盖各种活性成分在多个或独立容器(例如片剂、胶囊、粉末及液体)中共施用。粉末和/或液体在施用之前可重建或稀释至所需剂量。另外,此类施用还涵盖在大约相同的时间或在不同时间依序使用各类型治疗剂。在任一情况下,治疗方案将提供药物组合在治疗本文所述的病症或疾患方面的有益作用。

[0315] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术及科学术语具有与本发明所属的技术领域中的普通技术人员通常所理解相同的含义。虽然与本文所述的方法及材料类似或等同的方法及材料可用于实践本发明,但下文描述适合的方法及材料。本文中所提及的所有公开、专利申请、专利及其他参考文献均以全文引用的方式并入。在有矛盾的情况下,将以本说明书(包括定义)为准。另外,材料、方法及实例仅为说明性的且并不意欲为限制性的。本领域技术人员应能识别与本文所述的方法及材料类似或等同的方法及材料,其可用于本发明的实践中。实际上,本发明决不限于所述方法及材料。

实施例

实施例1:使用噬菌体展示产生人抗TSLP抗体及其Fab片段

[0316] 使用MorphoSys HuCAL **PLATINUM**®噬菌体展示技术产生特异性结合于人TSLP亚型1 (SEQ ID NO:27) 的Fab。噬菌粒文库基于 **HuCAL**®概念 (Knappik等人, 2000, J Mol Biol 296, 57-86) 且采用CysDisplay™技术以在噬菌体表面上展示Fab (Lohning, WO 2001/05950)。

淘选

[0317] 进行三种类型的淘选:针对直接包被的重组人TSLP (rhTSLP) 的固相淘选、固相淀粉蛋白前体蛋白质 (APP) 捕获淘选及针对TSLP的溶液淘选。

[0318] 对于针对直接包被的rhTSLP的固相淘选,将96孔Maxisorp™板在4℃下用每孔300μl源于大肠杆菌的rhTSLP (R&D Systems) 过夜包被。对于各淘选,将约 4×10^{13} 个HuCAL **PLATINUM**®噬菌体-抗体添加至经包被的各抗原中且在室温下在微量滴定板振荡器上孵育2小时。随后,非特异性结合的噬菌体通过数个洗涤步骤洗去,且特异性结合的噬菌体使用含25mM DTT的10mM Tris/HCl pH 8洗脱。将DTT洗脱液转移至14ml大肠杆菌TG1中且孵育以进行噬菌体感染。

[0319] 将经感染的细菌再悬浮于2×YT培养基,铺板于LB/Cam琼脂板上且孵育过夜。将菌落自板刮下且用于噬菌体救援、所选克隆的多克隆扩增及噬菌体产生。使用经纯化的噬菌体开始下一轮淘选。除抗原量降低及洗涤条件更严格以外,根据第一轮的方案进行第二及第三轮固相淘选。

[0320] 在针对食蟹猴TSLP的固相APP捕获淘选中,淘选中所用的抗原具有APP6 (淀粉状蛋白-前体-蛋白质) 标签,且抗原-APP6融合蛋白通过固定于Maxisorp™板上的小鼠抗APP6抗体捕获。为防止选择结合于抗原的APP6标签或结合于抗APP6捕获抗体的噬菌体,使用捕获抗体及不相关的APP6标记抗原预封闭噬菌体。

[0321] 96孔Maxisorp™板在4℃下用300μl抗APP抗体及不相关的APP6标记抗原过夜包被。在室温下在振荡器上捕获抗原人TSLP_Avi-APP6或食蟹猴TSLP_APP6-Avi,持续1小时。平行地,噬菌体预吸附于抗APP抗体及不相关的抗原上两次。

[0322] 除抗原包被及噬菌体封闭程序以外,如同上文所述的固相淘选类似地进行捕获淘选。

[0323] 对于针对TSLP的溶液淘选,噬菌体用50%人血清/0.33×化学阻断剂/0.05% Tween20封闭。每一噬菌体池,在1×化学阻断剂 (Chemiblocker) 中封闭4mg链霉亲和素珠粒 (**Dynabeads**®M-280链霉亲和素;Invitrogen)。为了移除链霉亲和素或珠粒结合的噬菌体,每次使用经封闭的链霉亲和素珠粒进行经封闭的噬菌体颗粒的预吸附两次。接着,将经生物素化的抗原人TSLP_Avi-APP6添加至噬菌体颗粒中。在孵育之后,使用链霉亲和素珠粒捕获噬菌体-抗原复合物且使用磁力分离器收集结合于链霉亲和素珠粒的噬菌体颗粒。非特异性结合的噬菌体通过使用PBS/0.05% Tween20及PBS的数个洗涤步骤洗去。特异性结合的噬菌体通过使用含25mM DTT的10mM Tris/HCl pH 8自链霉亲和素珠粒洗脱。根据固相淘选方案进行后续噬菌体感染及噬菌体产生且开始下一轮淘选。

表达

[0324] 为了促进可溶性Fab的快速表达,将所选HuCAL **PLATINUM**®噬菌体的Fab编码插

入物自 **pMORPH®**30展示载体亚克隆至**pMORPH®**x11表达载体**pMORPH®**x11_FH中。在大肠杆菌TG1-F-单个克隆转化之后,如先前所述进行含有**HuCAL®**-Fab片段的表达周质提取物的及制备(Rauchenberger等人,2003,J Biol Chem 278:38194-38205)。

[0325] 将氯霉素抗性单个克隆挑选至预填充有2×YT培养基的无菌384孔微量滴定板的孔中且在37℃下过夜生长。第二天早晨,将含有甘油的培养基添加至主板的各孔中;用铝箔密封板且储存在-80℃下。

ELISA筛选

[0326] 使用ELISA筛选,自淘选结果中鉴别结合于目标抗原的单个Fab克隆。使用含有Fab的粗大肠杆菌裂解物测试Fab。为了验证所制备的大肠杆菌裂解物中的Fab表达,用1:1000稀释于PBS中的Fd片段特异性绵羊抗人IgG包被Maxisorp™ 384孔板。在用含有0.05% Tween20的含5%脱脂奶粉的PBS封闭之后,添加含有Fab的大肠杆菌裂解物。随后,通过与缀合于碱性磷酸酶的F(ab)2特异性山羊抗人IgG(1:5000稀释)一起孵育,接着通过添加AttoPhos荧光底物(Roche,#11681982001)来检测所结合的**HuCAL®**-Fab片段。在430nm激发下记录535nm的荧光发射。

[0327] 为了对直接包被的抗原进行ELISA筛选,用含2μg/ml浓度的不同TSLP抗原的PBS包被Maxisorp™ 384孔板。在用含5%脱脂奶粉的PBS封闭板之后,添加含有Fab的大肠杆菌裂解物。通过缀合于碱性磷酸酶的F(ab)2特异性山羊抗人IgG(1:5000稀释)使用Attophos荧光底物(Roche,#11681982001)检测Fab的结合。在430nm激发下记录535nm的荧光发射。

[0328] 为了对APP捕获的抗原进行ELISA筛选,用含2.5μg/ml浓度的抗APP特异性抗体的PBS包被Maxisorp™ 384孔板。在用含5%脱脂奶粉的PBS封闭板之后,使2μg/ml浓度的APP标记的TSLP抗原在室温下结合1小时。接着添加含有Fab的大肠杆菌裂解物。通过缀合于碱性磷酸酶的F(ab)2特异性山羊抗人IgG(1:5000稀释)使用Attophos荧光底物(Roche,#11681982001)检测Fab的结合。在430nm激发下记录535nm的荧光发射。

[0329] 为了进行经生物素化的抗原的ELISA筛选,分别用1:1000稀释于PBS中的Fd片段特异性绵羊抗人IgG(The binding site,#PC075)或抗His特异性小鼠IgG(R&D Systems,#MAB050)包被Maxisorp™ 384孔板。在用含5%脱脂奶粉的PBS封闭之后,添加含有Fab的大肠杆菌裂解物。随后,使所捕获的**HuCAL®**-Fab片段分别结合于0.7-1.5μg/ml经生物素化的hu TSLP、hu TSLP或cy TSLP,其通过与缀合于碱性磷酸酶的链霉亲和素一起孵育,接着添加AttoPhos荧光底物(Roche,#11681982001)来检测。在430nm激发下记录535nm的荧光发射。

[0330] 经生物素化的抗原(2.5-5μg/ml)还捕获于经中性抗生物素蛋白包被的板。在用含5%脱脂奶粉的PBS封闭之后,添加含有Fab的大肠杆菌裂解物。通过缀合于碱性磷酸酶的F(ab)2特异性山羊抗人IgG(1:5000稀释)使用Attophos荧光底物(Roche,#11681982001)检测Fab的结合。在430nm激发下记录535nm的荧光发射。

[0331] 在对包被于NA板上的经生物素化的人TSLP_Avi-APP6及经生物素化的食蟹猴TSLP_APP6-Avi进行初级ELISA筛选时,分析9984个克隆(384个克隆/淘选子码)(参见3.4.4)。使用GENios Pro程序“PrimeScreen”分析ELISA结果。相比于背景信号分析结果。仅选择对于人抗原而言信号>10×背景的孔且对于食蟹猴抗原而言信号>5×背景的孔作为阳性。低于5×背景的信号可能为低表达的Fab、低亲和力的Fab、微量滴定板的边缘效应或不

可再现值的结果。溶液淘选产生3133个初级命中物,固相淘选产生240个初级命中物。在二级ELISA筛选中进一步分析1472个所选初级命中物。

[0332] 在二级ELISA筛选中使用不同抗原呈递模式,包括C端或N端Avi-APP6标记的抗原、直接包被的抗原、溶液中存在的经生物素化的抗原、源于HEK的抗原、源于大肠杆菌的抗原、抗原的去糖基化变体(经PNG酶处理)。另外,在二级筛选中分析与反目标IL-7的非特异性结合。为了排除生物素-结合剂及标签-结合剂,使用经生物素化的不相关的APP-Avi标记的抗原。使用GENios Pro程序“PrimeScreen”分析ELISA结果且相比于背景信号分析结果。对于不相关的抗原及反目标IL-7,仅选择信号<2倍背景的命中物。

[0333] 二级筛选的结果表明抗原呈递模式对于交叉反应性至关重要。对于去糖基化的抗原的筛选显示可存在靶向糖基-表位的结合剂。此外,标签位置及标签组成可由于构象变化而影响交叉反应性。克隆根据其交叉反应性简况分组,产生七个不同交叉反应性组。第1-3组包含单独或与源于HEK的抗原组合对源于大肠杆菌的huTSLP交叉反应的所有克隆。第4组包括至少与溶液中存在的人TSLP_Avi-APP6交叉反应的所有克隆。相比之下,第5组包括专门与溶液中的人TSLP_Avi-APP6交叉反应的所有克隆。在第6组中,存在与人TSLP_Avi-APP6及与去糖基化的人TSLP_Avi-APP6交叉反应的所有克隆,且在第7组中,存在与包括去糖基化抗原的所有源于HEK的抗原交叉反应的所有克隆。

测序及转化成IgG

[0334] 对出自交叉反应性第1-3组的73个克隆(与源于大肠杆菌的TSLP交叉反应的克隆)及出自第4-7组的569个克隆(与源于HEK的抗原交叉反应的克隆)进行序列分析。总共鉴别297个HCDR3独特的克隆,222个克隆为合并的(consolidated),且124个克隆以Fab格式纯化。

[0335] 来源于第三及第四测序分析的克隆立即进入IgG转化,且随后克隆至pMORPH® 4_IgG1f载体中以便在哺乳动物细胞中表达。

亲和力测定

[0336] 克隆的HuCAL® Fab及IgG版本的解离常数(K_D)测定如下进行:在室温下将含0.2 μ g/ml经生物素化的人TSLP的分析缓冲液包被于链霉亲和素MSD板上1小时。在抗原包被之前,链霉亲和素板在4℃下用具有3%BSA的PBS封闭过夜。在下文所述的条件下,使用人TSLP及食蟹猴TSLP进行溶液平衡滴定(SET)。使用抗体蛋白质的单体级分(至少90%单体含量,通过分析型SEC分析;分别地,Superdex75 (Amersham Pharmacia)用于Fab或Tosoh G3000SWXL (Tosoh Bioscience)用于IgG)。

[0337] 溶液中的亲和力测定基本上如文献(Friquet等人,1985,J Immunol Meth 77, 305-319)中所述进行。为了提高SET方法的灵敏性及精确性,将其自经典ELISA转变成基于ECL的技术(Haenel等人,2005,Anal Biochem 339,182-184)。根据生产商说明书,用MSD磺基-TAGTM NHS-酯(Meso Scale Discovery,Gaithersburg,MD,USA)标记1mg/ml山羊抗人(Fab)2片段特异性抗体(Dianova)。

[0338] 在聚丙烯微量滴定板中且含有0.5%BSA及0.02%Tween-20的PBS pH 7.4作为分析缓冲液进行实验。未标记的抗原以高于预期 K_D 至少10倍的浓度起始进行 2^n 系列稀释。使用无抗原的孔测定 B_{max} 值;使用仅含有分析缓冲液的孔测定背景。在添加适当量结合剂(抗体浓度类似于或低于预期 K_D ,60 μ l最终体积)之后,混合物在室温下过夜孵育。

[0339] 用抗原包被MSD板(30微升/孔)。在用具有0.02%Tween-20的PBS洗涤板之后,将经平衡的样品转移至那些板(30微升/孔)且孵育20分钟。在洗涤之后,将30微升/孔经MSD-磺基-标签标记的检测抗体(抗人(Fab) 2,最终稀释度通常为1:2,000)添加至MSD板中且在室温下在Eppendorf震荡器(700rpm)上孵育30分钟。

[0340] 在洗涤MSD板且添加30微升/孔具有表面活性剂的MSD读取缓冲液T之后,使用Sector Imager 6000(Meso Scale Discovery,Gaithersburg,MD,USA)检测电化学发光信号。

[0341] 通过XLfit (IDBS) 软件使用定制拟合模型评估数据。关于Fab分子的 K_D 测定,使用以下拟合模型(根据Haenel等人,2005),根据(Abraham等人,1996))修改:

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

$[Fab]_t$:所施用的总Fab浓度

x :所施用的总可溶性抗原浓度(结合位点)

$B_{\max}$:在无抗原的情况下Fab的最大信号

K_D :亲和力

[0342] 关于IgG分子的 K_D 测定,使用以下IgG的拟合模型(根据Piehler等人,1997修改):

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

$[IgG]$:所施用的总IgG浓度

x :所施用的总可溶性抗原浓度(结合位点)

$B_{\max}$:在无抗原的情况下IgG的最大信号

K_D :亲和力

[0343] 亲和力还可通过使用Biacore 3000或T200仪器(Biacore,GE Healthcare)测定动力学速率常数的Biacore表面等离子共振(SPR)来测定。通过直接包被的抗原的Biacore K_D 测定基本上如下进行:在SA芯片(Biacore,GE Healthcare)上捕获50RU经生物素化的抗原人TSLP。参考流槽1保持空白。在30 μ l/min的流率下,使用PBS pH7.2 GIBCO+0.05%Tween 20作为运行缓冲液。使用范围介于3.9至500nM的Fab浓度,其中注射体积为45 μ l且解离时间为300秒。通过2次注射5 μ l 10mM甘氨酸pH 1.5进行结合分析物的再生。使原始数据拟合于1:1结合模型,其中参数 $R_{\max}$ 设定成局部且RI设定成0。

亲和力成熟

[0344] 选择七种Fab候选物用于亲和力成熟。为了增加所选Fab的亲和力及生物活性,通过使用三核苷酸定向诱变的盒诱变平行地使L-CDR3及HCDR2区优化(Virnekas等人,1994, Nucleic Acids Res 22:5600-5607),而框架区保持恒定。为了使亲本Fab片段的L-CDR3优化,通过酶消化移除结合剂池的轻链(405bp)的LCDR3、框架4及恒定区且被多样化L-CDR3谱系连同框架4及恒定结构域置换。在第二文库集中,H-CDR2多样化,而连接框架区保持恒定。

使连接混合物电穿孔进入4ml大肠杆菌TOP10F细胞中,产生108至109个独立的菌落。此文库尺寸确保理论多样性的覆盖范围。如(Rauchenberger等人,2003,J Biol Chem 278:38194-38205)所述进行文库扩增。为了控制质量,随机挑选单个克隆且测序。为了选择亲和力改进的结合剂,使用经生物素化的抗原人TSLP_Avi-APP6及食蟹猴TSLP_APP6-Avi对来源于成熟文库的噬菌体进行三轮溶液淘选。通过降低每轮淘选的抗原浓度增加严格性(Low等人,1996,J Mol Biol 260,359-368.1996)。除抗原减少以外,进行解离速率选择(Hawkins等人,1992,J Mol Biol 226,889-896)。此与在室温下延长过夜的洗涤步骤组合。

[0345] 为了进一步增加一些所选抗体片段的亲和力及生物活性,通过使用三核苷酸定向诱变的盒诱变平行地使L-CDR1、L-CDR3、H-CDR2、H-CDR1区优化(Virnekas等人,1994,Nucleic Acids Res 22:5600-5607),而框架区保持恒定。

[0346] CDR中不需要翻译后修饰(PTM),因为此类抗体的效力可能视PTM的位置而潜在地降低,另外,PTM可能产生非均质化合物。在亲和力成熟前,产生不含NG、NS及DG位点的变体且与亲本克隆一起包括于池中,旨在于选择过程期间选择移除PTM的变体。在关于人TSLP的ELISA中测试所产生的变体的含有Fab的粗细菌细胞裂解物的抗原结合。变体的质粒DNA与亲本DNA混合以产生成熟文库。

[0347] 为了基于由Haenel等人,2005,Anal Biochem 339:182-184所述的原理通过溶液平衡滴定对成熟的结合剂进行排序,用不同浓度的抗原过夜平衡恒定量的经稀释的BEL提取物。接着,将混合物转移至事先用抗原包被的MSD板,且在孵育及洗涤之后,添加适合的经MSD-磺基-标签标记的检测抗体。随后,使用Sector Imager 6000(Meso Scale Discovery, Gaithersburg,MD,USA)通过ECL检测定量未结合的Fab的浓度。使用XLfit(IDBS)软件处理结果,应用相应的拟合模型估计亲和力且因此鉴别通过成熟改进最多的克隆。

产生

[0348] 用编码抗TSLP Fab或IgG的重链及轻链的

pMORPH®4

表达载体DNA转染真核HKB11细胞。转染后3或6天收集细胞培养物上清液。在无菌过滤之后,使用液体操作台对溶液进行蛋白质A亲和色谱法(MabSelect SURE,GE Healthcare)。若未另外陈述,则将缓冲液更换成1×杜尔贝科氏PBS(Dulbecco's PBS;pH 7.2,Invitrogen)且无菌过滤(0.2μm孔径)样品。通过UV分光光度法测定蛋白质浓度且在变性、还原条件下使用Labchip System(Perkin Elmer,USA)分析IgG的纯度。

抗TSLP Fab1

[0349] 抗TSLP Fab1来源于MOR011086家族,其在初步淘选中鉴别。MOR011086的亲和力成熟产生MOR014051,其在HC-CDR2中包括DG翻译后修饰基序。移除此DG基序产生MOR14701(DG→DA),其接着经胚系化以产生MOR014824,即表2中的Mab1。表2中的抗TSLP Fab1为Mab1的Fab片段。

[0350] 测定通过Kabat、Chothia或组合编号方案的抗TSLP Fab1重链CDR(HCDR)、轻链CDR(LCDR)的氨基酸序列以及重链及轻链可变区的氨基酸序列且在表2中列出。如通过SET所测定,抗TSLP Fab1以极高亲和力($K_D=6\text{pM}$)结合于重组人TSLP。抗TSLP Fab1不结合于结构上类似的细胞因子IL-7。

实施例2:在报告基因分析中抗TSLP Fab1针对重组及天然分泌的人TSLP的效力

[0351] 在荧光素酶报告基因分析中测试抗TSLP Fab1针对重组人TSLP、天然分泌的人

TSLP及食蟹猴TSLP的效力。

材料及方法

[0352] 天然分泌的人TSLP自通过用IL-1 β 、TNF- α 及IL-13刺激24小时人肺纤维母细胞而获得。

[0353] Ba/F3细胞经hTSLPR、hIL7R α 及Stat5-荧光素酶报告构建体转染。Stat5为TSLP信号传导的下游效应子。细胞在细胞生长培养基中生长：所述细胞生长培养基为具有10% FCIII (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)、1%青霉素/链霉素 (Invitrogen, Grand Island, NY)、1 μ g/ml嘌呤霉素 (Sigma, St. Louis, MO) 及5ng/ml重组人TSLP (rhTSLP, R&D Systems, Minneapolis, MN) 的RPMI 1640 (Invitrogen, Grand Island, NY)。使用具有10% FCIII、1%青霉素/链霉素及1 μ g/ml嘌呤霉素的RPMI 1640制备报告分析缓冲液。

[0354] Ba/F3细胞在T162cm²烧瓶中悬浮生长且一周两次以1:50分开。收集Ba/F3细胞且在对数生长中期通过在200 $\times$ g下离心5分钟沉淀并在无TSLP的细胞生长培养基中洗涤。重复此举且随后在无TSLP的条件中孵育18-24小时。第二天，细胞通过在200 $\times$ g下离心5分钟而再次沉淀，且再悬浮于报告分析缓冲液中达到1 $\times$ 10⁶个细胞/毫升的细胞浓度。10 μ L的1 $\times$ 10⁶个细胞/毫升的Ba/F3细胞在白色96孔Optiplate (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts) 的各孔中与70 μ L报告分析缓冲液组合。此后为抗体的10 μ L的6点1:10系列稀释 (100nM最高最终浓度) 且在湿润孵育箱中在37 $^{\circ}$ C/5%CO₂下孵育30分钟。最后，密封10 μ L的0.5ng/mL人或食蟹猴TSLP或经计算具有相同相对活性的浓度的天然分泌的TSLP的板以减少蒸发，且在湿润孵育箱中在37 $^{\circ}$ C/5%CO₂下孵育4小时。接着将板自孵育箱移出，且允许平衡至室温约15分钟。此后向各孔中添加100 μ L Steady-Glo试剂 (Promega, Madison, WI) 且在室温下孵育20分钟。接着在Envision仪器上使用发光程序 (照相机曝光1秒/孔) 读取板且在Microsoft Excel及Graphpad Prism中分析数据。

结果

[0355] 抗TSLP Fab1在荧光素酶报告基因分析中显示出极好的针对TSLP的全部三种形式的效力，其中针对重组人TSLP (1ng/ml) 的IC₅₀为15.4pM，针对天然分泌的人TSLP的IC₅₀为17.1pM且针对食蟹猴TSLP的IC₅₀为10.8pM。当计算多次实验 (n=3) 的平均报告基因分析结果时，Fab1针对重组人TSLP的平均IC₅₀值为15.3pM $\pm$ 1.5pM SEM。Fab1针对食蟹猴TSLP的平均IC₅₀值为9.5pM $\pm$ 0.9pM SEM。

[0356] 因此，抗TSLP Fab1为人及食蟹猴TSLP的强力抑制剂，其具有皮摩尔效力。抗TSLP Fab1显示出极好的针对自人肺纤维母细胞天然分泌的TSLP的效力的实情降低了由体内活性人TSLP与用于产生抗TSLP Fab的重组人TSLP的差异性糖基化引起问题的可能性。

实施例3：通过抗TSLP Fab1抑制TSLP诱导的初级人外周血单核细胞 (PBMC) 的TARC (胸腺及活化调节的趋化因子) 分泌

[0357] 为了测定抗TSLP Fab1是否能够在初级细胞驱动的反应的情形下中和TSLP，在抗TSLP Fab1存在或不存在下测试人或食蟹猴TSLP诱导的人PBMC的TARC分泌。

材料及方法

[0358] 用肝素 (Sigma, St. Louis, MO) 处理取自于健康供体的静脉血液且采集于50mL针筒并随后分成两个无菌离心管，每管25mL。这些管在低加速度及减速度下在1200rpm下离心20分钟，随后使用Pasteur吸液管移除血浆层。自每管转移20mL血液至新的50mL离心管中且向

每管中添加20mL PBS (1×, Invitrogen, Grand Island, NY) 及10mL 4% 葡聚糖 (w/v, Sigma, St. Louis, MO)。将管颠倒以彻底混合血液及葡聚糖且接着在室温下孵育30分钟以使得红细胞沉降。将20mL上清液转移至新的50mL离心管且用30mL PBS (1400rpm, 8分钟) 洗涤, 随后抽吸上清液并将细胞沉淀再悬浮于10mL PBS中。

[0359] 为了裂解红细胞, 将20mL无菌冷蒸馏水 (Sigma, St. Louis, MO) 添加至细胞中且用20mL stripette混合1分钟, 随后添加20mL无菌冷2×PBS以停止裂解。将管颠倒数次且在1400rpm下离心8分钟, 随后汇集至一个管中且用分析缓冲液洗涤两次 (1400rpm, 8分钟)。分析缓冲液用具有10%人AB血清 (Life Technologies, Grand Island, NY) 及1%青霉素/链霉素 (Invitrogen, Grand Island, NY) 的RPMI 1640 (GlutaMax, Invitrogen, Grand Island, NY) 制备。

[0360] 将细胞计数且以 10×10^6 个细胞/毫升的浓度再悬浮, 添加100μL至96孔平板的各孔中 (1×10^6 个细胞/孔)。向各孔中添加50微升/孔抗TSLP抗体且在37℃下保持孵育30分钟, 随后添加人或食蟹猴TSLP, 得到1ng/mL TSLP (66pM) 的最终浓度。孵育细胞24小时, 随后使板在1300rpm下离心5分钟且收集上清液用于通过ELISA的胸腺及活化调节的趋化因子 (TARC) 分析。上清液储存在-20℃下, 直至将其解冻用于TARC ELISA分析为止 (样品经测试为净样品)。

[0361] 按照生产商方案 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 进行TARC ELISA分析。简言之, 捕获抗体在无载剂蛋白质的PBS中稀释至工作浓度。用100微升/孔经稀释的捕获抗体包被 Microplate immuno maxiSorp板 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), 用顶部密封黏合盖密封板且在室温下过夜孵育。第二天, 抽吸捕获抗体且用洗涤缓冲液洗涤板, 重复该过程两次, 总计洗涤三次。通过使用歧管分配器 (manifold dispenser) 或自动洗涤器用300μL洗涤缓冲液填充各孔来洗涤各孔。在最后一次洗涤后, 通过将板颠倒并抵于干净的纸巾吸取来弃去剩余的洗涤缓冲液。接着, 通过向各孔中添加300μL试剂稀释剂 (含1% BSA的PBS) 封闭板。板在室温下孵育最少1小时。重复洗涤步骤且每孔添加100μL含样品或标准品的试剂稀释剂。板用黏合带覆盖且在室温下孵育2小时。接着重复抽吸/洗涤步骤且向各孔中添加100μL经稀释的检测抗体, 用新黏合带覆盖且在室温下孵育2小时, 随后如先前所述重复洗涤步骤。向各孔中添加100μL链霉亲和素-HRP的工作稀释液且接着将板再覆盖并在室温下孵育20分钟, 避免将板置于直射光下。接着重复抽吸/洗涤步骤且向各孔中添加100μL TMB底物溶液。板在室温下在黑暗中孵育多至20分钟, 接着添加50μL终止溶液。将板温和地敲打以确保各孔混合且立即使用设定成450nm的微量滴定板读取器测定各孔的光密度。

结果

[0362] 抗TSLP Fab1为重组人TSLP诱导的人PBMC的TARC分泌的极强力抑制剂, 其针对1ng/mL重组人TSLP的IC₅₀为20.3pM且IC₉₀为99.65pM。抗TSLP Fab1展示为食蟹猴TSLP诱导的人PBMC的TARC分泌的强力抑制剂, 其针对1ng/mL重组食蟹猴TSLP的IC₅₀为11.3pM。当计算多次实验 (n=3) 的平均人PBMC结果时, Fab1针对重组人TSLP的平均IC₅₀值为19.7pM ± 1.9pM SEM。Fab1针对食蟹猴TSLP的平均IC₅₀值为11.1pM ± 0.5pM SEM。

实施例4: 通过抗TSLP Fab1抑制TSLP诱导的初级食蟹猴外周血单核细胞 (PBMC) 的MDC (源于巨噬细胞的趋化因子) 分泌

材料及方法

[0363] 将食蟹猴静脉血液采集至Covance (Dedham, MA) 的含有肝素锂 (lithium heparin) 的真空管中。将来自各供体的30ml血液转移至50ml离心管中且在低加速度及减速度下在1200rpm下离心20分钟,随后使用Pasteur吸液管移除血浆层,在层间留下0.5cm间隙。使剩余底层细胞再悬浮且转移10ml至新的离心管,接着加入10ml 1×PBS及5ml 4%葡聚糖 (w/v, Sigma, St. Louis, MO), 随后将管颠倒4-5次以完全混合。所有管在室温下在通风橱中孵育25分钟以使得RBC沉降在管底部。将10mL上清液转移至新的50ml离心管且用40ml培养基 (1400rpm, 8分钟) 洗涤, 随后抽吸上清液并将细胞沉淀再悬浮于5mL 1×PBS中。

[0364] 为了裂解红细胞, 将20mL无菌冷蒸馏水 (Sigma, St. Louis, MO) 添加至细胞中且用20ml stripette混合1分钟, 随后添加20ml无菌冷2×PBS以停止裂解。将管颠倒数次且在1400rpm下离心8分钟, 随后汇集至一个管中且用培养基洗涤两次 (1400rpm, 8分钟, 4℃)。培养基用具有10% Fetal clone III (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) 及1%青霉素/链霉素 (Invitrogen, Grand Island, NY) 的RPMI 1640 (GlutaMax, Invitrogen, Grand Island, NY) 制备。

[0365] 使用台盼蓝染料对细胞进行计数且将细胞以 10×10^6 个细胞/毫升的浓度再悬浮, 添加100 μ l至96孔平板的各孔中 (1×10^6 个细胞/孔)。向各孔中添加50微升/孔抗TSLP抗体 (100nM最高最终浓度) 且在37℃下保持孵育30分钟, 随后添加食蟹猴TSLP, 得到0.5ng/ml TSLP (33pM) 的最终浓度。孵育细胞24小时, 随后将板在1400rpm下离心8分钟且收集上清液用于通过ELISA分析源于巨噬细胞的趋化因子 (MDC, CCL22)。上清液储存在-20℃下, 直至将其解冻用于MDC ELISA分析 (在添加至ELISA板之前1:2稀释于分析缓冲液中) 为止。按照生产商方案 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 进行MDC ELISA分析。

结果

[0366] 抗TSLP Fab1展示为重组食蟹猴TSLP诱导的食蟹猴PBMC的MDC分泌的强力抑制剂, 其针对0.5ng/ml重组食蟹猴TSLP的IC₅₀为55.5pM。当计算多次实验 (n=3) 的平均食蟹猴PBMC结果时, Fab1针对食蟹猴TSLP的平均IC₅₀值为25.1pM $\pm$ 5.9pM SEM。

实施例5: 抗TSLP Fab1的物种交叉反应性

材料及方法

[0367] 进行Biacore表面等离子共振 (SPR) 结合分析以确定抗TSLP Fab1是否结合于人、小鼠或大鼠TSLP蛋白质。Biacore试剂, 包括S系列传感器芯片CM5、HBS-EP+缓冲液、人Fab捕获试剂盒、EDC (1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺)、NHS (N-羟基丁二酰亚胺)、乙醇胺、BIA标准化溶液、70% (w/w) 甘油及甘氨酸, 购自GE Healthcare。用于Fab捕获及TSLP结合分析的运行缓冲液为具有10mM HEPES (pH 7.4)、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05% v/v表面活性剂P20的1×HBS-EP+。重组人、食蟹猴或小鼠TSLP (MW 15kDa) 获自R&D Systems (Minneapolis, MN)。重组大鼠TSLP (MW 15.4kDa) 获自USCN Life Science Inc. (Wuhan, China)。

[0368] 使用捕获方法以制备在Biacore CM5芯片上的抗TSLP Fab1, 随后注射人、小鼠或大鼠TSLP。按照生产商说明书, 使用人Fab捕获试剂盒将人Fab结合剂固定于CM5芯片的全部四个流槽中。规定在10 μ L/min的流率下的接触时间为360秒。样品隔室的温度为10℃且分析温度为25℃; 在固定之前, CM5芯片用HBS-EP+激活且用BIA标准化溶液标准化。通过使15 μ L的0.5mg/mL储备液与360 μ L的pH5固定缓冲液 (均提供于人Fab捕获试剂盒中) 组合来制备

375uL的20ug/mL人Fab结合剂。所得固定水平为在Fc1、2、3及4中大约4000-4400RU人Fab结合剂。

[0369] 使用定制Biacore方法建立动力学分析,其中每一循环捕获约14RU抗TSLP Fab1。此通过以10uL/min的流率注射HBS-EP+缓冲液中的5nM抗TSLP Fab1,接触时间60秒,接着30秒稳定期来达成。样品隔室的温度为10℃且分析温度为25℃。使用此定制Biacore方法,建立动力学分析以评估hTSLP、mTSLP及rTSLP与所捕获的抗TSLP Fab1的相互作用。对于每一抗原,在HBS-EP+中制备以下10种浓度且注射于抗TSLP Fab1表面上,包括0nM缓冲液空白、10nM、5nM、2.5nM、1.25nM、0.625nM、0.313nM、0.156nM、0.078nM、0.039nM、0.02nM。在捕获约14RU抗TSLP Fab1之后,以45uL/min注射抗原360秒,接着600秒(对于所有测试浓度)或1200秒(对于0nM及2.5nM抗原浓度)解离时间。在每一循环之后,通过以10uL/min注射10mM甘氨酸-HCl pH 2.0历时60秒,接着用HBS-EP+缓冲液额外洗涤来达成Fab结合剂表面的再生。样品隔室的温度为10℃且分析温度为25℃。

[0370] 在由Biacore T200控制软件控制的Biacore T200仪器上运行所有SPR实验及分析。使用Biacore T200评估软件处理数据。标绘减去空白的传感图用于抗TSLP Fab1的种间交叉反应性的定性分析。

结果

[0371] Biacore SPR交叉反应性实验结果显示抗TSLP Fab1与重组人TSLP紧密结合,而不存在与重组大鼠或小鼠TSLP的可检测的结合,其与人与啮齿类动物TSLP之间的低同源性(约40%)相符。

[0372] 抗TSLP Fab1以极高亲和力结合于食蟹猴重组TSLP且在荧光素酶报告基因分析中为重组食蟹猴TSLP的极强力抑制剂(针对1ng/ml重组TSLP的 $IC_{50}=10.8pM$)。在初级人及食蟹猴PBMC分析中,抗TSLP Fab1为重组食蟹猴TSLP诱导的人PBMC的TARC分泌($IC_{50}=11.3pM$)及重组食蟹猴TSLP诱导的食蟹猴PBMC的MDC分泌($IC_{50}=55.5pM$)的极强力抑制剂。

[0373] 因此,抗TSLP Fab1显示受限的物种交叉反应性,识别重组食蟹猴TSLP,但不识别大鼠或小鼠TSLP。

实施例6:小鼠抗TSLP抗体在哮喘的鼠疾病模型中的功效

材料及方法

[0374] 在全身性卵白蛋白(OVA)敏感化接着局部抗原攻击肺的鼠模型中评定TSLP中和对于过敏性气道反应的作用。此模型的特征在于Th2表型的出现及相关嗜酸性粒细胞性炎症。由于实施例1的抗TSLP Fab1如实施例5中所述不与啮齿类动物TSLP蛋白质交叉反应,故使用市售替代性抗小鼠TSLP单克隆抗体(MAB555,R&D Systems,Minneapolis,MN)评定TSLP中和的作用,该单克隆抗体据报导完全中和重组鼠TSLP的生物活性,其针对0.5nM鼠TSLP的 IC_{50} 为约1.3nM(数据由R&D Systems供应)。针对所有细胞因子及趋化因子的特定ELISA试剂盒还购自R&D systems。

[0375] 雌性Balb/c小鼠在第1天及第14天经OVA(或生理盐水)及矾作为佐剂免疫接种。简言之,小鼠腹膜内经含有吸附于1.6mg氢氧化铝(Sigma)中的100μg卵白蛋白(5×结晶,Sigma,UK)的0.2mL 0.9%wt/vol NaCl(生理盐水)免疫接种。在第21天,小鼠用以气溶胶形式给与的OVA或生理盐水攻击且在24小时后处死。通过支气管肺泡灌洗术(BAL)内的差异性 & 总细胞计数评定炎症,同时通过特异性ELISA测量细胞因子及趋化因子。

[0376] 在最后一次鼻内OVA或PBS攻击之后二十四小时,小鼠通过腹膜内注射4mg/Kg戊巴比妥钠(Rhone Merieux,Harlow,UK)麻醉。通过气道插管且用总共1.2ml生理盐水性溶液洗涤肺(3次,每次0.4mL)来收集BAL流体。对于各样品,测定总细胞计数且进行细胞离心涂片器(cytospin)准备(Shandon Scientific Ltd.,Cheshire,UK)。细胞用Diff-Quik(Baxter Dade AG,Dudingon,Switzerland)染色且使用标准形态准则进行200个细胞的分类计数。

[0377] 为了评定TSLP消除对于反应致敏阶段的作用,在OVA致敏之前一小时静脉内施用抗鼠TSLP单克隆抗体(10mg/Kg)或大鼠IgG2a同种型对照且在第14天加强(boost)之前再次施用。为了评定TSLP在攻击时的作用,一些小鼠仅在第21天OVA雾化之前一小时给与抗体。在静脉内施用这些抗体时未观察到不良效应。

[0378] 结果表示为指示数目的实验的平均值 $\pm$ SEM。使用单因素方差分析(ANOVA)确定各组中的显著性。若发现显著差异,则使用未配对学生T检验评定平均值之间的可比性。 $p \leq 0.05$ 的值视为显著的。

结果

[0379] OVA致敏及攻击使得支气管肺泡灌洗术流体内的细胞数目相比于对照动物增加,所述细胞包括嗜酸性粒细胞及中性粒细胞(图3)。此与先前在单个抗原攻击后经历的反应相符。此外,经OVA致敏/攻击的小鼠的灌洗流体内的多种炎性调节物相比于对照还上调(图4A-图4C)。

[0380] 抗鼠TSLP抗体处理(10mg/kg)显著抑制BAL流体内的细胞总数大约50%,而嗜酸性粒细胞计数降低80%。在不存在抗原致敏的情况下抗体处理未显著改变灌洗物的基线细胞组成。对TSLP活性的下游标记物的分析揭露与过敏性气道炎症相关联的细胞因子IL-13(图4A)及趋化因子嗜酸细胞活化趋化因子-2及TARC(其均为由TSLP刺激的树突状细胞产生的Th2细胞及嗜酸性粒细胞的已知化学引诱剂)(图4B及图4C)的水平降低。

实施例7:抗TSLP Fab1在大鼠中的药代动力学表征

材料及方法

[0381] 在静脉内(IV)快速注射、气道内滴入(ITI)或20分钟仅鼻吸入1mg/kg单个标称剂量的喷雾抗TSLP Fab1之后,在大鼠中研究抗TSLP Fab1的药代动力学(PK)及肺沉积。在多个给药后时间点测定血浆、BAL流体以及肺组织匀浆样品中的抗TSLP Fab1浓度(在肺血管结构的BAL及血液灌注之后)。

结果

[0382] 在IV注射之后,抗TSLP Fab1自体循环快速清除,平均终末消除半衰期为约3小时。在ITI或吸入之后,抗TSLP Fab1缓慢吸收至体循环中,两种途径均在约2小时达到血浆C_{max},且平均终末半衰期长于在IV施用之后测定的平均终末半衰期(与在IV之后3小时相比,在ITI之后7小时及在吸入之后4小时),表明吸收速率限制的动力学。抗TSLP Fab1的全身性生物利用度平均在ITI之后约6%及在吸入之后1%,可能归因于在ITI之后的肺沉积分数相比于吸入较高。在ITI或吸入之后,BAL流体及肺组织匀浆中的抗TSLP Fab1浓度与低全身性暴露相比高得多(>100倍以上),在给药后2、6、24或72小时占自全部三种基质回收的总剂量的97-99%(对于BAL,66-79%,且对于肺,20-31%)。BAL及肺匀浆中抗TSLP Fab1所估计的沉积半衰期分别平均约7及9小时。

实施例8:抗TSLP Fab1在猴中的药代动力学表征

材料及方法

[0383] 在以1、10及20mg/kg剂量的每日1小时吸入持续14天(第3-5组)或1mg/kg IV接着在16天清除期之后20mg/kg单吸入剂量的交叉单剂量施用(第6组)之后,在食蟹猴中研究抗TSLP Fab1的毒物动力学PK/PD及肺分布。采集连续血液样品用于PK/PD,评定总TSLP作为PD标记物及免疫原性评定。另外,还采集肺组织匀浆样品(终末)及BAL流体样品(第3-5组终末及PK第6组在静脉内剂量之前及终末)用于PK、总TSLP及免疫原性(仅对于BAL流体)评定。

结果

[0384] 在吸入之后血清中抗TSLP Fab1的全身性暴露量低,其中在20mg/kg吸入剂量水平下所估计的生物利用度小于1%。1mg/kg吸入剂量不产生任何可检测的全身性暴露量且10及20mg/kg吸入剂量展示可比的抗TSLP Fab1的全身性暴露量。在吸入之后约3小时达到C_{max}。与大鼠PK类似,在吸入之后的全身性消除半衰期(约7小时)与IV(约2.3小时)相比较长,表明吸收速率限制的动力学。在给药14天之后,观察到血清中的暴露量积聚。与低血清暴露量(图5)相比,关于终末BAL流体及肺匀浆中抗TSLP Fab1浓度的初步数据高得多且随着剂量增加而增加(图6)。

实施例9:抗TSLP Fab1的结晶学及表位定位

[0385] 在此实施例中,抗TSLP Fab1在游离状态或与人TSLP复合时结晶,且测定相应晶体结构。基于X射线数据的对抗TSLP Fab1结合于人TSLP的分析提供对人TSLP上抗TSLP Fab1的表位的洞察。

材料及方法

人TSLP及抗TSLP Fab1的制备及纯化

[0386] 通过在室温(RT)下,在具有10mM DTT的100mM Tris(pH 7.0)中用21μg木瓜蛋白酶消化抗TSLP mAb1(10.6mg)2小时来产生抗TSLP Fab1。用30μM木瓜蛋白酶抑制剂E64停止反应。抗TSLP Fab1接着在用20mM磷酸钠(pH 7.0)平衡的5mL Lambda Select柱上纯化。Fab用0.1M柠檬酸pH 3.0洗脱,且立即用1:10稀释的1M Tris pH 8.5调节所收集的级分的pH。LC-MS分析显示47107.7Da的质量观察值,其与预期氨基酸序列匹配,所述预期氨基酸序列具有在Thr228之后裂解且在其氨基端携有焦谷氨酸残基的重链。对于结晶,通过使用超滤装置重复浓缩-稀释步骤而将缓冲液更换成10mM Tris-HCl pH 7.4、25mM NaCl,且样品最终浓缩成13mg/ml抗TSLP Fab1。

[0387] 克隆带有N端六组氨酸标签(SEQ ID NO:40)后接PreScission(HRV-3C蛋白酶)裂解位点的人TSLP(Uniprot条目Q969D9;氨基酸29至159)的构建体且表达于大肠杆菌中作为包涵体。对于再折叠,使用Avestin®高压匀浆机使89.4g大肠杆菌细胞在具有1mM EDTA、6mM MgCl₂及0.375M蔗糖的715ml 50mM Tris(pH 7.0)中裂解。在与3.7kU benzonase一起孵育30分钟之后,使用SS-34固定角转子使裂解物在13,000rpm下离心30分钟。将沉淀再悬浮于387ml具有20mM EDTA、0.5M NaCl、2% Triton X-100的100mM Tris(pH7.0)中且随后在13,500rpm下离心50分钟。将沉淀再次再悬浮于387ml具有20mM EDTA的100mM Tris pH 7.0中,在13,500rpm下离心30分钟,且重复此洗涤程序四次,产生13g包涵体。包涵体接着溶解于65ml具有50mM乙酸钾(pH 5.0)、5mM EDTA及10mM TCEP的6M盐酸胍溶液中。在室温下孵育2小时之后,样品在20,000rpm(SS-34固定角转子)下离心30分钟。上清液(70ml)用上文所述的盐酸胍溶液稀释至100ml。通过在4℃下用10L具有0.5M精氨酸盐酸盐、5mM EDTA及1mM

GSH的100mM Tris (pH 8.25) 快速稀释来进行再折叠。在稀释之后,添加0.1mM谷胱甘肽二硫化物 (GSSG) 且在4℃下在缓慢搅拌下孵育再折叠混合物7天。接着用乙酸调节pH至5.1,且添加0.1mM GSSG以破坏剩余TCEP。略微混浊的再折叠溶液通过Sartobran 0.65/0.45μm过滤器囊盒过滤且用Pellicon 10kD交叉流膜浓缩至750ml。浓缩溶液相对于10L 50mM乙酸钠pH 5.4进行透析。回收约550mg再折叠的TSLP。对最终纯化样品的LC-MS分析证实所有二硫键桥形成且显示94%去Met产物 (MW=16862.8Da) 及6%具有N端甲硫氨酸的蛋白质。对于与抗TSLP Fab1一起结晶,使用未用PreScission蛋白酶裂解N端标签的再折叠TSLP样品。

[0388] 为了制备TSLP-Fab复合物,将含两倍摩尔过量的His₆-PreSc-TSLP蛋白质(揭示为SEQ ID NO:40的“His6”)的具有50mM NaCl的25mM Tris (pH 7.4) 添加至抗TSLP Fab1中,通过超滤浓缩样品至约10mg/ml,装载于SPX-75尺寸排阻色谱法柱上且在具有25mM NaCl的10mM Tris-HCl pH 7.4中等度(isocratically)洗脱。峰级分通过超滤浓缩至9.2mg/ml且提交进行结晶筛选。

结晶及X射线数据收集

[0389] 晶体通过坐滴式蒸汽扩散而在96孔板 (Innovadyne SD2板) 中生长。具体而言,0.2 μl蛋白质储备液与0.2μl储液槽溶液混合,且液滴在20℃下相对于80μl相同储液槽溶液平衡。使用Phoenix机器人系统 (Art Robbins Instruments) 建立实验,储存于RockImager hotel (Formulatrix) 中且自动成像。

[0390] 对于X射线数据收集,将一种晶体直接安置于低温环中且急骤冷却至液氮中。在具有Pilatus像素检测器的Swiss Light Source beamline X10SA,使用1.00001Å X射线照射收集X射线数据集。在两种情况下,在345mm的晶体至检测器距离下记录每0.25°振荡的720个影像且用XDS版本Dec.6,2010, (Kabsch 1993, J Appl Crystallogr;26:795-800) 处理,如在APRV中所实施。

结构测定及分析

[0391] 使用抗CD132抗体Fab片段的晶体结构作为起始模型,通过使用程序Phaser (McCoy等人,2007, J Appl Crystallogr 40:658-674) 的分子置换来测定抗TSLP Fab1的结构。基于与抗TSLP Fab1的序列相似性来选择抗CD132抗体Fab。使用可变结构域及第一恒定结构域作为独立的检索模型以允许Fab弯角的可变性。使用模型构建的迭代循环,接着使用程序Coot 0.8.0 (Crystallographic Object-Oriented Toolkit;Emsley等人,2010, Acta Crystallogr Sect D: Biol Crystallogr;66:486-501) 及Autobuster 2.11.5 (Bricogne等人,2011, BUSTER版本2.11.2. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.) 进行自动化结晶优化来优化结构。

[0392] 使用游离抗TSLP Fab1及先前内部确定的与另一抗体的Fab片段复合的人TSLP的优化结构,通过使用程序Phaser的分子置换来测定TSLP-Fab复合物的结构。同样,使用抗TSLP Fab1的可变结构域及第一恒定结构域作为独立的检索模型。如先前关于游离Fab所述,使用Coot 0.8.0及Autobuster 2.11.5优化结构。

[0393] 使用程序Coot (Emsley等人,2010, Acta Crystallogr Sect D: Biol Crystallogr;66:486-501) 及PyMOL (分子图形系统;DeLano Scientific: Palo Alto, CA) 进行晶体结构的目视检查。使用程序Coot及PROCHECK v3.3 (Laskowski等人,1992, J Appl Crystallogr;26:283-291) 评定最终优化模型的质量。在与抗TSLP Fab1结合后变得溶剂较

不可及的人TSLP的残基通过CCP4程序套件 (Collaborative Computational Project, 第4号, 1994) 的程序AREAIMOL来鉴别。分子间接触使用 $4.0\text{\AA}$ 的截止距离来定义且使用CCP4程序NCONT来鉴别。

结果

抗TSLP Fab1的晶体结构

[0394] 游离抗TSLP Fab1及其与人TSLP的复合物通过在 19°C 下的坐滴式蒸汽扩散方法而在96孔板中结晶。令人关注的是,两种蛋白质样品在相同结晶条件下结晶: $0.17\text{M}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 85mM 乙酸钠 $\text{pH } 5.6$ 、 25.5% PEG MME 2000、 15% 甘油。晶体在4-5周之后出现且在数天内生长至完整尺寸。

[0395] 游离Fab晶体呈斜方晶空间群 $P2_12_12_1$,其中每一不对称单元一个Fab分子。Fab-TSLP复合物的晶体呈空间群 $I222$,其中每一不对称单元一个复合物(表3)。两种晶体经折射达到高分辨率,且可自其中的每一个收集具有良好质量及高度冗余的完整折射数据集(表3)。

[0396] 使用先前确定的人TSLP结构通过分子置换进行结构测定。使用autobuster优化得到良好的优化统计数据及总体几何结构(表3)。两个抗体残基Asp50L及Asp152L为游离Fab结构中的拉马钱德兰离群值(Ramachandran outlier)。除此这两个残基以外,第三抗体残基Tyr103H也是Fab-TSLP复合物结构中的拉马钱德兰离群值。此三个残基具有明确界定的电子密度且因此为真正的几何结构离群值。值得重视的是,Asp50L及Tyr103H为如下所述的TSLP结合中所涉及的CDR残基。

[0397] 抗TSLP Fab1重链及轻链的氨基酸序列提供于图1A及图1B,其中CDR加下划线(如Kabat, 1991, Sequences of proteins of immunological interest, NIH公开号91-3242所定义)且位于抗体-抗原界面的残基经*标记。

表3 X射线数据收集及优化统计数据

	游离抗TSLP Fab1	Fab1与人TSLP的复合物
数据收集		
空间群	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	I222
a, b, c (Å)	69.05, 72.33, 113.58	77.68, 78.46, 233.23
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00
分辨率(Å)	1.85 (1.90-1.85)*	2.00 (2.05-2.00)*
R _{对称} 或R _{合并}	0.044 (1.108)	0.071 (1.83)
I / σ (I)	21.4 (1.42)	16.6 (1.14)
完整率(%)	99.9 (99.8)	99.9 (99.9)
冗余	6.6 (6.2)	6.6 (6.4)
优化		
分辨率(Å)	37.00-1.85	40.00-2.00
反射数	49,249	48,502
R _{工作} / R _{游离}	0.201 / 0.222	0.194 / 0.214
原子数		
蛋白质	3,245	4,042
硫酸根离子	0	3x5
水	213	195
B因子(Å ²)		
Fab轻链(链L)	45.7	52.4
Fab重链(链H)	48.3	48.5
TSLP (链T)	-	98.5
水(链W)	51.4	53.1
均方根偏差		
键长(Å) / 角度(°)	0.009 / 1.05	0.010 / 1.07
注意: (*) 括号中的数值对应于高分辨率壳。		

与人TSLP复合的抗TSLP Fab1的晶体结构

[0398] 此实施例中所用的重组人TSLP的氨基酸序列(SEQ ID NO:38)提供于图2中。成熟人TSLP始于Tyr29。此处所用的构建体具有N端六组氨酸标签(SEQ ID NO:40)(残基15-20),接着为HRV-3C蛋白酶(PreScission)识别位点(残基21-28)及由克隆产生的残基11-14。Asn64及Asn119为潜在的N-连接糖基化位点;且残基127-130构成潜在的弗林蛋白酶裂解位点(RRKR,SEQ ID NO:39)。二级结构要素展示在氨基酸序列下方:方块表示 α -螺旋A、B、C及D,且粗线表示环区。

[0399] TSLP未显现与细胞因子IL-2超家族的其他成员的任何显著氨基酸序列相似性。然

而,TSLP以如同IL-2、IL-7及许多其他细胞因子一样的上-上-下-下拓扑结构折叠为四螺旋束(图7)。螺旋 α_A 具有靠近其中心、围绕Thr46位置的强扭结。螺旋 α_B 及 α_C 相当短,仅各自具有三个转角;且C端螺旋 α_D 较长,具有几乎五个转角(图7)。三个二硫化物(Cys34-Cys110、Cys69-Cys75、Cys90-Cys137)稳定此短链四螺旋束。然而, α_A 与 α_B 及 α_C 与 α_D 之间的两个交叉连接大部分无序且未见于此晶体结构中。来自 α_B - α_C 环的三个氨基酸及最后五个羧基末端残基还在最终优化结构中缺失。潜在的弗林蛋白酶裂解位点及N-糖基化位点位于缺失的连接内。

[0400] Fab-TSLP复合物的三维结构的总体视图展示于图7中。

[0401] 抗TSLP Fab1主要结合于TSLP的螺旋 α_A ,其通过在一侧由H-CDR1及H-CDR2内衬且在另一侧由H-CDR3及L-CDR3内衬的浅凹槽来运作。螺旋 α_A 的明显扭结占据凹槽的中心部分。侧接螺旋 α_C 及 α_D 以及 α_A - α_B 环的前四个残基提供与抗体的额外接触。

[0402] Fab-TSLP复合物的形成埋藏大约 $1700\text{\AA}^2$ 的组合的溶剂可及表面,其中25个Fab氨基酸残基及25个TSLP氨基酸残基在复合物形成后经历其溶剂可及表面的减少。其中,当使用 $4.0\text{\AA}$ 距离截止时,20个Fab残基及16个TSLP残基(参见表4)涉及直接分子间接触。形状互补性统计Sc(Lawrence及Colman,1993,J Mol Biol;234:946-50)等于0.72,其为抗体-蛋白质复合物的相对高值(Sundberg及Mariuzza,2003,Adv Protein Chem;61:119-60)。抗TSLP Fab1的所有六个CDR有助于结合于TSLP。此外,位于抗体-抗原界面处的六个明确界定的水介导结合相互作用。

表4.表位及互补位残基

TSLP表位		抗TSLP Fab1互补位	
结构要素	接触残基	接触残基	结构要素

α_A	Lys38	Thr28H	H-CDR1
	Ala41	Tyr32H	H-CDR1
	Leu44	Tyr103H, Ile102H, Tyr48L	H-CDR3, L-CDR2
	Ser45	Asp31H, Tyr32H	H-CDR1
	Thr46	Asp56H	H-CDR2
	Ser48	Tyr103H	H-CDR3
	Lys49	Trp33H, Glu101H, Tyr103H, Tyr104H, Tyr105H	H-CDR1, H-CDR3
	Ile52	Tyr103H, Tyr104H, Tyr31L, Trp92L	H-CDR3, L-CDR1, L-CDR3
	Thr53	Trp92L	L-CDR3
$\alpha_A - \alpha_B$ 环	Ser56	Trp92L	L-CDR3
	Gly57	Trp92L	L-CDR3
	Thr58	Trp92L	L-CDR3
	Lys59	Gly28L, Ser29L, Lys30L, Tyr31L, Asp50L, Asn65L	L-CDR1, L-CDR2, L-FR3
α_C	Lys101	Asp56H	H-CDR2
α_D	Gln145	Tyr103H, Tyr31L	H-CDR3, L-CDR1
	Arg149	Asn51L, Glu52L	L-CDR2
直接接触的表位及互补位残基的清单来源于通过CCP4程序NCONT使用4.0Å距离截止最终优化的坐标。			

[0403] 通过在复合物形成后计算 (i) 非氢原子之间小于 $4.0\text{\AA}$ 的分子间接触及 (ii) 溶剂可及表面的减少而自结晶学坐标鉴别位于结合界面处的TSLP残基。结果以图形方式展示于图8中, 且TSLP表位的抗体视图提供于图9中。如由此两个图可见, 螺旋 α_A 连同 $\alpha_A - \alpha_B$ 环的前四个残基一起形成表位的核心, 且提供分子间接触总数及TSLP上埋藏的溶剂可及表面的82%。

此外,绝大部分关键表位残基在此区中发现:Lys49、Ile52、Gly57及Lys59。相比而言,螺旋 α_C 及 α_D 提供极少表位残基:Lys101(α_C)、Gln145及Arg149(α_D)。

[0404] 抗TSLP Fab1的全部六个互补决定区(CDR)提供结合界面,如由在抗原结合后其溶剂可及表面减少及其对直接分子间接触的作用所证明(图10A及图10B)。另外,轻链的第三框架区(L-FR3)的Asn65L还位于抗原结合界面,但其仅与TSLP的Lys59进行弱(3.6Å)H键结的相互作用。

[0405] H-CDR3环发挥尤其重要的作用。Glu101H与TSLP的Lys49进行关键盐桥相互作用,且位于环顶端的三个连续酪氨酸Tyr103H、Tyr104H及Tyr105H共同地提供由完整重链进行的接触的58%。H-CDR1的Trp33H及H-CDR2的Asp56H还为重要的互补位残基,其分别有助于与TSLP的Lys49及Lys101的结合。

[0406] Trp92L为唯一与抗原进行直接接触的L-CDR3残基。此残基位于L-CDR3的顶端且其未采用游离抗TSLP Fab1的晶体结构中所定义的构象。然而,在TSLP复合物中,侧链具有明确界定的电子密度且与 α_A - α_B 环进行广泛接触,其贡献总计由完整轻链进行的接触的42%。L-CDR2的Asp50L及L-CDR1的Tyr31L为由轻链提供的另外两个重要的互补位残基。前者与TSLP的Lys59进行极短(2.8Å)的静电相互作用。后者提供与TSLP的Ile52、Lys59及Gln145的结合相互作用,且还通过与Tyr103H及Tyr104H的 π - π 相互作用而稳定H-CDR3环的结合构象。

抗TSLP Fab1的作用模式

[0407] TSLP信号传导需要组装包含TSLP、同源TSLPR链及共享的IL-7R α 链的三元复合物。TSLP-TSLPR二元复合物的形成为募集IL-7R α 链的前提条件。人TSLP-Fab1复合物基于所有TSLP C α 原子而迭置于小鼠TSLP-TSLPR-IL-7R α 三元复合物上。结构重迭证明抗TSLP Fab1阻断TSLP结合于TSLPR及IL-7R α 。TSLP的螺旋 α_A 为抗TSLP Fab1表位的中心要素(图11B),且此螺旋还在结合于TSLPR及IL-7R α 方面发挥中心作用(图11A)。另外,螺旋 α_C 参与IL-7R α 结合且螺旋 α_D 为TSLPR结合界面的一部分。由于此两个螺旋还提供抗TSLP Fab1表位,故抗TSLP Fab1与两个受体链之间的空间干扰为广泛的。抗体轻链与TSLPR的D2结构域广泛重迭,而重链与IL-7R α D2结构域且还与D1结构域的一些细胞因子结合环重迭(图11C)。数据表明抗TSLP Fab1通过清除细胞因子且防止其结合于TSLPR受体来中和TSLP,由此阻断与IL-7R α 形成高亲和力信号传导复合物。

[0408] 总而言之,确定呈游离状态或与再折叠的重组人TSLP复合的抗TSLP Fab1的高分辨率晶体结构。发现抗TSLP Fab1主要结合于人TSLP的螺旋 α_A (氨基酸残基Lys 38至Thr53),而螺旋 α_C (Lys101)及 α_D (Gln145、Arg149)与 α_A - α_B 环(氨基酸残基Ser 56至Lys 59)具有极少但重要的作用。人TSLP与抗TSLP Fab1的复合物结构重迭于公开的具有IL-7RA及TSLPR细胞外结构域的小鼠TSLP复合物上表明抗TSLP Fab1与IL-7RA及TSLPR竞争结合TSLP。抗TSLP Fab1结合的TSLP无法结合TSLPR且IL7R α 受体的募集还由于Fab与IL-7 α 受体之间的广泛位阻而受到抑制。

实施例10:抗TSLP Fab1的喷雾干燥方法及制剂

喷雾干燥设备及操作

[0409] 使用定制喷雾干燥器喷雾干燥原料。喷雾干燥器构型包含单喷嘴双流体雾化器、干燥腔室、旋风器、适配器、分离阀及在温控夹套中的1公升收集器。在本文所描述的实施方案中,喷雾干燥方法可包括雾化方法、干燥方法及颗粒收集方法。

[0410] 示例性雾化方法可包括以下步骤：(A1) 经配制的原料流体可通过蠕动泵 (Watson Marlow) 以控制流率馈送至安装于喷雾干燥器中的单喷嘴空气辅助雾化器；(A2) 将经压缩的干燥空气以控制流率馈送至同心收敛气体喷嘴；及 (A3) 空气在喷嘴尖口处膨胀使得原料流体雾化成微细液滴喷雾。

[0411] 干燥方法可包括以下步骤：(B1) 将用电加热器加热的干燥空气以设定温度及控制流率馈送至干燥腔室；(B2) 使热干燥空气与步骤A3的微细液滴喷雾相互作用。液滴中的溶剂(水)蒸发,产生固体颗粒；及 (B3) 颗粒及溶剂蒸汽/空气以预定温度排出干燥腔室。

[0412] 颗粒收集方法可包括以下步骤：(C1) 使步骤B3的颗粒及非溶剂蒸汽/空气以高切向速度进入旋风器；(C2) 颗粒通过离心力与空气混合物分离且在旋风器底部收集于温控收集容器中；及 (C3) 排出的非溶剂蒸汽/空气通过滤膜且排放至分离器内部的氛围。

抗TSLP Fab1的可吸入粉末的工艺及制剂

[0413] 此部分提供用于制备包含用各种赋形剂配制的抗TSLP Fab1颗粒的可吸入粉末的配制及喷雾干燥方法。其涉及喷雾干燥包含蛋白质(抗TSLP Fab1)及主要充当分散性增强剂(例如三亮氨酸)或玻璃形成剂(例如糖类、缓冲盐)的赋形剂的单相含水原料。原料的pH用组氨酸-HCl缓冲液控制在pH 5.0-pH 5.5的目标pH下。通过应用颗粒工程改造原理,选择赋形剂及组合物以产生包含皱颗粒的粉末,各皱颗粒具有由改进粉末分散性及保护活性剂的疏水性赋形剂的壳围绕的稳定在玻璃态基质内的蛋白质核心。

表5. 抗TSLP Fab1制剂

批号	抗TSLP Fab1	组胺酸	海藻糖	甘露醇	三亮氨酸
	% w/v	% w/v	% w/v	% w/v	% w/v
569-38-01	80	20	0	0	0
569-38-02	90	10	0	0	0
569-38-03	60	10	30	0	0
569-38-04	60	5	20	5	10
569-38-05	40	5	35	0	20
569-38-06	40	5	30	5	20

[0414] 图12展示具有较高赋形剂:蛋白质比率的制剂改进抗TSLP Fab1的物理化学稳定性且减小抗TSLP Fab1的聚集率。

包含抗TSLP Fab1的PulmoSol制剂

[0415] 此部分提供在不同总固体浓度及三亮氨酸含量下配制以增加制备产量及使壳形成优化的进料的组成。高固体浓度增加粉末产量。与先前实施例相比,在此实施例中,TSLP Fab1含量固定在50%,一个除外。

表6. 包含抗TSLP Fab1及三亮氨酸的制剂

批号	固体含量	抗TSLP Fab1	组胺酸	三亮氨酸	海藻糖	摩尔比
	% w/v	% w/w	% w/w	% w/w	% w/w	糖: 药物
728-06-01	1.5%	50.0%	5.89%	20.0%	24.1%	70.4
728-06-02	2.0%	50.0%	5.89%	15.0%	29.1%	85.0
728-06-03	2.5%	50.0%	5.89%	10.0%	34.1%	99.6
728-06-04	2.0%	50.0%	5.89%	10.0%	34.1%	99.6
728-06-05	1.5%	40.0%	4.71%	20.0%	30.3%	110.6

包含抗TSLP Fab1及15%三亮氨酸的制剂

[0416] 此部分强调经设计以适应三亮氨酸的有限水溶解度同时维持原料及所得颗粒的可接受的pH的数种制剂。此处,将三亮氨酸溶解于HCl水性溶液中且使用各种碱性介质返滴定以达到原料溶液的目标pH (pH 5.0-pH 5.5)。需要大约1:1摩尔比的HCl比三亮氨酸以完全溶解三亮氨酸。

表7. 包含抗TSLP Fab1及15%三亮氨酸的制剂

批号	抗TSLP FAB1	组胺酸	海藻糖	三亮氨酸	酸, HCl	碱	
	% w/v	% w/w	% w/w	% w/w	% w/w	% w/w	
569-60-01	50.0%	5.64%	26.8%	15.0%	2.56%	N/A	
569-60-02	50.0%	5.64%	19.4%	15.0%	2.56%	组胺酸	7.40%
569-60-03	50.0%	5.64%	24.1%	15.0%	2.56%	KOH	2.69%
569-60-04	50.0%	5.64%	26.8%	15.0%	2.56%	NH ₄ OH	2.70%

实施例11:通过溶液平衡滴定 (SET) 测定抗TSLP Fab1对人及食蟹猴TSLP蛋白质的结合亲和力

[0417] 进行溶液平衡滴定 (SET) 测量以测定抗TSLP Fab1对人及食蟹猴TSLP蛋白质的结合亲和力。Fab在恒定浓度下与各抗原的系列稀释液一起孵育。自竞争曲线推断出结合亲和力,该竞争曲线通过相对于所施用的抗原浓度标绘未结合抗体的浓度读数产生。抗TSLP Fab1对所有人及食蟹猴TSLP蛋白质显示低皮摩尔浓度 (pM) 范围的结合亲和力。

分析程序

[0418] 制备人TSLP (在HEK细胞中产生) 及食蟹猴TSLP抗原于样品缓冲液中的二十二个系列1.6ⁿ稀释液且添加恒定浓度的Fab1。60微升/孔体积的各抗原-Fab混合物一式两份地分布于384孔聚丙烯微量滴定板 (MTP)。样品缓冲液充当阴性对照且仅含有Fab1的样品充当阳性对照 (Bmax)。将板密封且在室温 (RT) 下在震荡器上孵育过夜 (o/n, 至少16小时)。

[0419] 384孔MSD阵列MTP在4℃下用30微升/孔以5μg/ml稀释于PBS中的hsTSLP (在大肠杆菌中产生) 包被过夜,接着用70微升/孔洗涤缓冲液洗涤三次且在室温下在震荡器上用50微升/孔封闭缓冲液封闭1小时。在洗涤之后,将30微升/孔体积的平衡的抗原-Fab混合物自聚丙烯MTP转移至经包被的MSD板且在室温下孵育20分钟。

[0420] 在另一洗涤步骤之后,将30μl以1.8μg/ml稀释于样品缓冲液中的磺基标记的检测抗体添加至各孔中且在室温下在震荡器上孵育30分钟。洗涤MSD板且添加35微升/孔1×MSD

读取缓冲液并在室温下孵育5分钟。产生ECL信号且通过MSD Sector Imager 6000测量。

[0421] 对各抗原进行三次独立实验且证实稳定的分析条件。根据这些实验,如下所示计算解离平衡常数 K_D 的平均值及标准偏差。

表8.Fab1结合于人及食蟹猴TSLP蛋白质的亲和力常数(K_D)

FAB	抗原	K_D (pM)	实验数
Fab1	人类TSLP (HEK)	5.0 ± 2.0	3
Fab1	食蟹猴TSLP	1.4 ± 0.6	3

实施例12:食蟹猴中的两周吸入剂量范围探索研究

[0422] 在此非GLP研究中,目标为在向食蟹猴施用测定Fab1(抗胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)Fab)的潜在毒性,施用通过吸入途径每日施用一次,持续14天,或在第1天以单次剂量IV注射,随后13天为非给药期且在第15天为单次吸入剂量。另外,研究Fab1的药代动力学/药效学(PK/PD)简况及免疫原性(IG)。

[0423] 以单个研究的两个单独组成部分形式来进行研究。

[0424] 仅吸入:Fab1 PulmoSol粉末(含39.7%Fab1的PulmoSol)通过吸入以1.0、10.0及20.0毫克Fab1/公斤/天的目标日剂量施用给3组(3只雄性/组)食蟹猴。另一组猴(2只雄性)接受安慰剂PulmoSol粉末且充当对照。另外单只雄性动物仅接受空气且充当空气对照。使用旋转电刷产生器装置(RBG1000)产生Fab1 PulmoSol气溶胶及安慰剂PulmoSol气溶胶。使用紧密配合的口鼻罩使动物暴露于Fab1 PulmoSol粉末(第3至5组)或安慰剂PulmoSol粉末(第2组)的气溶胶,目标60分钟,每日一次,持续14天。使用相同的设备设定使第1组单只雄性动物仅暴露于经过滤的干燥空气,持续相同的目标持续时间。向第3、4及5组总共施用的Fab1的平均气溶胶浓度分别为0.036、0.31及0.66mg/L。第3、4及5组的总体平均(估计的总)递送剂量分别为1.1、9.6及19.9毫克Fab1/公斤/天。质量中值空气动力学直径(MMAD)证实,所产生的Fab1气溶胶为猴可吸入的且测试物种将实现可接受的肺部沉积。

[0425] 静脉内/吸入:Fab1在第1天以单次静脉内快速注射形式通过隐静脉施用给一组3只雄性动物(第6组)。目标剂量为1毫克Fab1/公斤。接着,使动物具有13天非给药期,随后在第15天通过吸入施用Fab1 PulmoSol粉末(含39.7%Fab1的PulmoSol)。目标剂量为20毫克Fab1/公斤。使用旋转电刷产生器装置(RBG1000)产生Fab1 PulmoSol气溶胶。使用紧密配合的口鼻罩使动物在单个时刻暴露于Fab1 PulmoSol粉末的气溶胶,目标60分钟。接着保留动物6天,随后在第21天安乐死。总共施用的Fab1的平均气溶胶浓度为0.60mg/L。总体平均估计的总递送剂量为16.3毫克Fab1/公斤/天。质量中值空气动力学直径(MMAD)证实,所产生的Fab1气溶胶为猴可吸入的且测试物种将实现可接受的肺部沉积。

[0426] 在此研究中评估以下参数及端点:临床症状、体重、体重变化、临床病理学参数(血液学、凝血及临床化学)、Fab1与TSLP浓度及毒理动力学参数的生物分析(血清、支气管肺泡灌洗术(BAL)流体、肺组织提取物)、抗Fab1抗体(血清及BAL流体)、总体尸检发现、器官重量及组织病理学检查(仅第1至5组)。

[0427] 通过吸入给药施用Fab1持续14天在雄性食蟹猴的鼻腔(增加呼吸道上皮内的粘液细胞)、肺(弥漫性肺泡巨噬细胞积聚、增加细支气管-肺泡淋巴细胞性及混合肺泡炎性细胞浸润)及支气管淋巴结(增加一般细胞性)内产生明显变化。这些变化在所有处理组的动物当中显而易见。在所有情况下,研究结果的严重程度为最低程度至轻度且观察结果未视为

不良的。

[0428] 总体而言,在所有用Fab1处理的动物中,基于血清、支气管肺泡(BAL)及肺提取物中的浓度数据证明暴露于Fab1;而在来自空气或安慰剂PulmoSol对照动物的任何样品中均未检测到Fab1。在第15天的吸入剂量之后,生物利用度经计算为大约0.2%。仅在第1天给药前第4组的一只动物及在第14天第5组的一只动物的血清中检测到抗Fab1抗体,但所观察到的信号不视为对这些动物暴露于Fab1具有明显影响。在研究中总体上没有检测到对Fab1的明显免疫原性。除在第一洗涤样品(在BAL程序期间自三只经Fab1处理的动物收集)中检测到一些极低信号以外,在大部分样品的血清、BAL或肺组织中未检测到总TSLP。

[0429] 总之,Fab1在第1天以单次静脉内快速注射形式施用给3只食蟹猴,随后为13天非给药期且在第15天以单次吸入剂量形式施用未产生不良效应。向食蟹猴吸入施用Fab1持续14天与所有处理组动物的鼻腔、肺及支气管淋巴结内的明显变化相关联。在所有情况下,研究结果的严重程度为最低程度至轻度且观察结果未视为不良的。接受Fab1的所有动物全身性暴露于测试物品。

实施例13:食蟹猴中的十三周吸入毒性研究

[0430] 此研究的目标为当每日通过吸入途径给与食蟹猴一次、持续至少92个连续日(13周)时,测定Fab1(抗胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP) Fab)的潜在毒性,及评估在42天(6周)恢复期之后任何发现的潜在可逆性。另外,测定Fab1的毒理动力学及免疫原性特征。

[0431] Fab1 PulmoSol粉末通过吸入以3、10及22毫克/公斤/天的目标日剂量施用给3组(3只/性别/组)食蟹猴。另一组猴(3只/性别)接受安慰剂PulmoSol粉末且充当对照。安慰剂及22毫克/公斤/天组中的额外2只动物(2只/性别)在研究中维持6周恢复期。使用旋转电刷产生器装置(RBG1000)产生Fab1 PulmoSol气溶胶及安慰剂PulmoSol气溶胶。使用紧密配合的口鼻罩使动物暴露于Fab1 PulmoSol粉末(第2至4组)或安慰剂PulmoSol粉末(第1组)的气溶胶,目标60分钟,每日一次,持续至少92个连续日。

[0432] 在此研究中评估以下参数及端点:临床症状、体重、体重变化、眼科检查、神经检查(包括呼吸速率)、心电图、临床病理学参数(血液学、凝血、临床化学及尿分析)、外周血淋巴细胞免疫表型(流式细胞术)、免疫功能(对匙孔血蓝蛋白(KLH)的T细胞依赖性抗体反应(TDAR))、Fab1浓度及毒理动力学参数的生物分析(血清及肺组织提取物)、抗Fab1抗体(血清)、总体尸检发现、器官重量及组织病理学检查。

[0433] 向第2、3及4组总共施用的Fab1的平均气溶胶浓度分别为0.10、0.33及0.72mg/L。第2、3及4组所估计的总体平均达成的总递送剂量(性别组合)分别为3.0、10.1及22.2毫克/公斤/天Fab1。质量中值空气动力学直径(MMAD)证实,所产生的Fab1气溶胶为猴可吸入的且测试物种将实现可接受的肺部暴露。

[0434] 在以所达成的3、10或22毫克/公斤/天的剂量施用Fab1后,未观察到对心血管参数中的任一者的明显测试物品相关效应。

[0435] 免疫功能(TDAR)研究结果指示在所达成的 ≥ 10.1 毫克/公斤/天的剂量下抗KLH IgG抗体水平降低的趋势。在最后一个取样时间点(研究第78天),在所达成的 ≥ 3 毫克/公斤/天的剂量下注意到抗KLH IgG及IgM抗体水平降低。此效应在雄性中在所有时间点及在雌性中在第78天最明显,但在其他取样时刻在雌性中较不显著。抗KLH反应降低的趋势不视为不良的。第4组(22.2毫克/公斤/天)恢复动物在所有时刻的抗KLH IgG及IgM抗体水平在

与同时对照(第1组)恢复值相比时较高,且与对照(第1组)主要研究结果类似,支持降低的抗KLH抗体反应恢复。在所达成的3毫克/公斤/天的剂量下通过吸入给药施用Fab1至少92天使得肺内淋巴组织的细胞性增加。在所有情况下,研究结果的严重程度为最低程度至轻度且不视为不良的。在6周恢复期之后,在2/4(50%)的恢复动物中不存在研究结果且在2/4(50%)的高剂量动物中观察到处于最低严重程度。相同研究结果还存在于一只对照恢复雌性动物中(轻度),证实此变化可能偶尔在对照动物当中偶发发现。在安慰剂PulmoSol对照(第1组)动物的血清或肺组织样品中的任一者中未检测到Fab1。总体而言,用Fab1处理的动物在整个给药期显示暴露于Fab1,而在血清及肺组织中均具有剂量相关的增加。在第92天的最后一次剂量后,在多至14-28天的恢复期间还显示血清中的全身性暴露,而在所有恢复动物中截至在第135天(在最后一次剂量后的42天)尸检时,肺组织浓度为不可检测的。在所有剂量组的重复日剂量之后,暴露于Fab1的血清自研究第1天至研究第91天存在显著积聚。未观察到暴露量的明显性别相关差异。在两只安慰剂PulmoSol对照动物中在给药前基线及给药后时间点均观察到低但是可检测的抗药物抗体(ADA)信号,其可能归因于预先存在不特异性针对Fab1的抗体。在任何其他对照动物中未检测到ADA信号。所有经Fab1处理的动物早在研究第28天起即出现给药后ADA信号。三只动物的强ADA信号表面上与血清中Fab1的暴露损失相关联,但这些动物在尸检时(在最后一次剂量后1~6小时)仍显示肺暴露于Fab1。总之,在至多22.2毫克/公斤/天可吸入达成的剂量下向食蟹猴吸入施用Fab1持续13周具有良好耐受性。已证实所有接受Fab1的动物具有Fab1的全身性及肺暴露。抗Fab1抗体早在第28天起即存在于所有经处理动物中且与3只受试者中的暴露量比其余经处理动物低得多相关联。显微镜评估证实所有经Fab1处理的动物中的大部分的肺淋巴组织的细胞性增加,其在6周恢复期之后在50%高剂量恢复动物中观察到。在所有情况下,研究结果的严重程度为最低程度至轻度且不视为不良的。

实施例14:单克隆抗体片段的简单喷雾干燥制剂的制备

[0436] 本文所述的单克隆抗体片段Fab1的分子量为46.6kDa。已描述干粉制剂用于局部肺递送以治疗哮喘。在此上下文中,使用术语“简单”指制剂仅具有活性药物成分(Fab1)及缓冲液。

[0437] 一系列包含89.5%活性药物成分及10.5%组氨酸缓冲液的简单抗体制剂由包含各种乙醇/水溶剂组合物的进料制备(表9)。乙醇含量在5%与20%w/w之间变化。进料在NSD喷雾干燥器上喷雾干燥,其中入口温度为105℃,出口温度为70℃,干燥气体流率为595L/min,雾化器气体流率为20L/min,液体进料速率为8.0mL/min且ALR为 2.5×10^3 v/v。固体含量固定在2%w/v下。

表9. 工艺参数对于包含89.5%API于组氨酸缓冲液中的简单抗体制剂的微晶粒学特性的影响

批号	API (%w/w)	三亮氨酸 (% w/w)	固体 (%w/v)	EtOH (% w/w)	PPSD (μm)			敲紧密度 (g/cm ³)
					x10	x50	x90	
761-22-07	89.5	0	2	0	0.55	1.34	3.24	0.347
761-02-09	89.5	0	2	5	0.66	1.93	5.64	0.178
761-02-06	89.5	0	2	10	0.73	2.48	7.19	0.142
761-02-07	89.5	0	2	20	0.69	1.94	6.04	0.135

实施例15:抗体的简单喷雾干燥制剂的微晶粒学特性

[0438] 实施例14的喷雾干燥抗体制剂的微晶粒学特性展示在表9中。所有仅包含API及缓冲液的简单制剂产生具有光滑颗粒表面(即,无表面波纹)的颗粒。添加少量乙醇至含水原料降低粉末的容积密度及敲紧密度(胰岛素制剂还观察到)。颗粒还在其初始粒度分布(PPSD)方面相对较大。

实施例16:抗体的简单喷雾干燥制剂的气溶胶效能

[0439] 针对实施例15中叙述的粉末所测定的DD及TLD展示在表10中。初始颗粒计算所得的中值空气动力学直径 d_a 在0.71与0.93 μm 之间(使用以下等式自敲紧密度及x50测量值计算所得: $d_a = d_g \sqrt{\rho_p}$)。

[0440] Concept1干粉吸入器为基于低阻力囊盒的装置($R=0.07\text{cm H}_2\text{O}^{1/2}/(\text{L}/\text{min})$)。表10.简单抗体制剂的气溶胶效能。气溶胶效能使用Concept1吸入器(20mg填充质量)在90L/min的流率及2L的总体积下评定($n=5$)。

批号	敲紧密度 (g/cm^3)	x50 (μm)	Da (计算) (μm)	形态	DD (% ND)	TLD (% DD)
761-22-07	0.347	1.34	0.79	光滑	64.9	65.0
761-02-09	0.178	1.93	0.81	光滑	77.0	57.1
761-02-06	0.142	2.48	0.93	光滑	81.2	43.7
761-02-07	0.135	1.94	0.71	光滑	74.3	57.7

[0441] 由表10中的数据清楚可知,仅降低密度不足以能够形成有效避免在口腔-咽喉中沉积的颗粒。为此,颗粒形态必须经修饰以增加表面皱度(波纹)且初始粒度降低将为合乎需要的。

[0442] 令人关注的是,应注意,虽然肽及小蛋白质在不存在壳形成赋形剂的情况下天然采用波纹形态,但抗体的制剂需要添加壳形成赋形剂以便能够形成波纹颗粒。在此方面,壳形成赋形剂及乙醇的添加在修饰壁厚及喷雾干燥颗粒的密度方面发挥类似的作用。因此,在壳形成剂存在下,添加乙醇的影响较小。

实施例17:抗体的平台喷雾干燥制剂的制备及微晶粒学特性

[0443] 在此系列喷雾干粉中,喷雾干燥条件保持恒定,且评定添加壳形成赋形剂(即,三亮氨酸,0-15%w/w)对抗体制剂的影响。这些制剂还含有作为玻璃形成剂的海藻糖(约29-44%w/w,视三亮氨酸含量而定)及组氨酸缓冲液(5.9%w/w,pH 5.0)。

[0444] 粉末在定制NSD喷雾干燥器上喷雾干燥,其中入口温度为105 $^{\circ}\text{C}$,出口温度为70 $^{\circ}\text{C}$,干燥气体流率为595L/min,雾化器气体流率为25L/min,液体进料速率为10.0mL/min,且ALR为 $2.5 \times 10^3 \text{v}/\text{v}$ 。固体含量在2%w/w下保持恒定。所有粉末具有波纹形态,批次761-02-12除外,其在不存在壳形成剂的情况下喷雾干燥且产生与实施例16中所观察到的颗粒类似的光滑颗粒。结果展示于表11中。在一些实施方案中,本发明的干粉制剂包含核壳颗粒,所述核壳颗粒包含:壳形成赋形剂及包含API、玻璃形成赋形剂及缓冲液的核心,有时在本文中还称为平台制剂。

表11.工艺参数对于包含50.0%w/w API、5.9%组氨酸缓冲液、海藻糖及三亮氨酸

的“平台”抗体制剂的微晶粒学特性的影响

批号	API (%w/w)	三亮氨酸 (% w/w)	EtOH (% w/w)	PPSD (μm)			敲紧密度 (g/cm^3)
				x10	x50	x90	
728-06-04	50.0	10.0	0	0.55	2.28	5.14	0.366
728-06-02	50.0	15.0	0	0.64	2.06	4.83	0.197
761-02-12	50.0	0.0	10	0.48	1.60	4.87	0.158
761-22-06	50.0	5.0	10	0.50	1.63	3.85	0.268
761-02-11	50.0	10.0	10	0.63	2.25	5.75	0.176
761-02-10	50.0	15.0	10	0.67	2.30	5.27	0.112

实施例18:具有不同三亮氨酸含量的抗体的“平台”喷雾干燥制剂的气溶胶效能

[0445] 针对实施例17中所述的粉末所测定的DD及TLD展示在表12中。

表12. 工艺参数对于平台抗体制剂的微晶粒学特性及气溶胶效能的影响。气溶胶效能使用Concept1吸入器(20毫克填充质量)在90L/min的流率及2L的总体积下评定(n=5)。

批号	乙醇/ 固体	敲紧密度 (g/cm^3)	x50 (μm)	Da (计算) (μm)	形态	DD (% ND)	TLD (% DD)
728-06-04	0	0.366	2.28	1.38	波纹	90.0	83.3
728-06-02	0	0.197	2.06	0.91	波纹	90.0	80.0
761-02-12	5	0.158	1.60	0.64	光滑	69.0	66.2
761-22-06	5	0.268	1.63	0.84	波纹	89.2	79.1
761-02-11	5	0.176	2.25	0.94	波纹	92.3	84.8
761-02-10	5	0.112	2.30	0.77	波纹	93.1	83.0

[0446] 具有波纹颗粒形态的抗体制剂观察到DD及TLD的显著改进。在本发明的实施方案中,所需波纹形态由颗粒表面上存在壳形成赋形剂三亮氨酸而产生。

[0447] 在本发明的实施方案中,颗粒表面上的材料的物理化学特性影响颗粒形态。对于大蛋白质(诸如大于20,000道尔顿的某些蛋白质),为了达成所需形态,诸如三亮氨酸的壳形成赋形剂为优选的。在本发明的实施方案中,形成制剂及组合物的颗粒具有波纹形态以减小颗粒之间的凝聚力,使得聚结物的尺寸足够小以便聚结物可被吸入。

[0448] 当添加乙醇时,其通过减小壁厚而降低(另外)波纹颗粒的颗粒密度。其继而降低敲紧密度,使得较小初始颗粒能够符合所需空气动力学特性。在一些实施方案中,颗粒的密度应降低,以使得初始颗粒及聚结物可被吸入。

[0449] 当乙醇含量自0%增加至10%w/w时,注意到配对的制剂728-06-04与761-02-11及728-06-02与761-02-10的敲紧密度显著减小。对于此实施例中的特定制剂,仅添加10%乙醇未获得气溶胶效能优于由壳形成赋形剂提供的气溶胶效能的目标改进。TLD为极好的(>80%的DD),但仍低于90%w/w的DD的所需目标,大部分因为颗粒太大且太密集。对于波纹颗粒,计算所得的初始空气动力学直径 D_a 范围介于0.77至1.38 μm 。

实施例19:经修饰的工艺参数(固体含量及共溶剂添加)对于平台抗体制剂的微晶粒学特性的影响

[0450] 制剂包含50.0%w/w API、5.9%w/w组氨酸缓冲液(pH 5.0)、约14%w/w或29%w/w海藻糖及15%w/w或30%w/w三亮氨酸。粉末在定制NSD喷雾干燥器上喷雾干燥,其中入口温度为105℃,出口温度为70℃,干燥气体流率为595L/min,雾化器气体流率为30L/min,液体进料速率为4.0mL/min且ALR为 7.5×10^3 v/v。固体含量减小至1%w/w。喷雾干燥方法中的这些修饰经设计以减小初始粒度。在本发明的实施方案中,观察到初始粒度分布的显著减小。

表13.工艺参数对于包含50.0%w/w API、5.9%组氨酸缓冲液、海藻糖及三亮氨酸的“平台”抗体制剂的微晶粒学特性的影响

批号	API (%w/w)	固体 (%w/v)	三亮氨酸 (% w/w)	EtOH (% w/w)	PPSD (μm)			敲紧密度 (g/cm ³)
					x10	x50	x90	
761-22-01	50.0	1.0	15.0	5	0.39	1.33	2.59	0.282
761-22-02	50.0	1.0	15.0	10	0.51	1.31	2.59	0.232
761-22-03	50.0	1.0	15.0	20	0.53	1.36	2.94	0.151
761-02-04	50.0	1.0	15.0	30	0.55	1.44	3.15	0.162
761-22-05	50.0	1.0	30.0	20	0.64	1.58	2.94	0.122

实施例20:经修饰的工艺参数(固体含量及共溶剂添加)对于平台抗体制剂的气溶胶效能的影响

[0451] 固体含量减小及ALR增加对于平台抗体制剂的气溶胶效能的影响展示在表14中。观察到初始颗粒的中值空气动力学直径相对于实施例18中的颗粒显著减小。此翻译成TLD在约94%与98%的DD之间,即在效能的所需、优选或最佳目标范围内。

表14.工艺参数对于平台抗体制剂的微晶粒学特性及气溶胶效能的影响。气溶胶效能使用Concept1吸入器(20mg填充质量)在90L/min的流率及2L的总体积下评定(n=5)。

批号	乙醇/ 固体	敲紧密度 (g/cm ³)	x50 (μm)	形态	D _a (计算) (μm)	DD (% ND)	TLD (% DD)
761-22-01	5	0.282	1.33	波纹	0.71	92.4	97.8
761-22-02	10	0.232	1.31	波纹	0.63	93.9	95.1
761-22-03	20	0.151	1.36	波纹	0.53	92.1	95.6
761-02-04	30	0.162	1.44	波纹	0.58	93.7	95.0
761-22-05	20	0.122	1.58	波纹	0.55	95.0	93.7

[0452] 除非另外定义,否则本文所用的技术及科学术语均具有与其由熟悉本发明所属领域的专家通常所理解相同的含义。

[0453] 如本领域技术人员应清楚,除非另外指明,否则所有未特定详细描述的方法、步骤、技术及操作可以本身已知的方式进行且已以本身已知的方式进行。例如再次参考标准手册及本文中提及的一般背景技术及其中所引用的其他参考文献。

[0454] 除非另外指明,否则本文中所引用的参考文献各以全文引用的方式并入本文中。

[0455] 本发明的申请权利要求为非限制性的且提供于下文中。

[0456] 虽然本文已详细揭示特定方面及权利要求,但其已借助于实施例仅仅出于说明的目的进行,且不意欲对所附权利要求的范畴或任何对应将来申请的权利要求的主旨范畴具有限制性。具体而言,本发明人预期在不背离如权利要求所界定的本发明的精神及范畴下可对本发明进行各种取代、改变及修改。相信核酸起始物质、感兴趣的克隆或文库类型的选择对于具有本文中描述的方面的知识的一般技术者而言为惯例。认为其他方面、优点及修改在以下权利要求的范畴内。本领域技术人员应仅仅使用常规实验即可识别或能够确定本文中所述的本发明的特定方面的许多等同物。此类等同物意欲由以下权利要求所涵盖。在后来申请的对应申请中权利要求范畴的改写可归因于各国家的专利法律的限制且不应解释为放弃权利要求的主旨。

[0457] 示例性的技术方案

本发明例如还包括以下技术方案:

1. 一种特异性结合人胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP) 的分子,其选自以下中的任一:

a) 包含以下的分子:

包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的重链互补决定区1 (HCDR1);

包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的重链互补决定区2 (HCDR2);

包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的重链互补决定区3 (HCDR3);

包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的轻链互补决定区1 (LCDR1);

包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的轻链互补决定区2 (LCDR2);及

包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的轻链互补决定区3 (LCDR3);

b) 包含以下的分子:

包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的HCDR1;

包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的HCDR2;

包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的HCDR3;

包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的LCDR1;

包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的LCDR2;及

包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的LCDR3;

c) 包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:7的重链可变区及含有氨基酸序列SEQ ID NO:17的轻链可变区的分子;

d) 包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:22的重链及含有氨基酸序列SEQ ID NO:25的轻链的分子;

e) 包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:9的重链及含有氨基酸序列SEQ ID NO:19的轻链的分子;

f) 包含含有以下残基中的至少一个的互补位的分子:重链序列SEQ ID NO:22的Thr28、Asp31、Tyr32、Trp33、Asp56、Glu101、Ile102、Tyr103、Tyr104、Tyr105或轻链序列SEQ ID NO:25的Gly28、Ser29、Lys30、Tyr31、Tyr48、Asp50、Asn51、Glu52、Asn65及Trp92;

g) 结合人TSLP且包含以下的抗体片段:

包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的HCDR1;

包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的HCDR2;

包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的HCDR3;
包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的LCDR1;
包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的LCDR2;及
包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的LCDR3;
及

h) 结合人TSLP、包含以下的抗体片段:

包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的HCDR1;
包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的HCDR2;
包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的HCDR3;
包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的LCDR1;
包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的LCDR2;
及包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的LCDR3。

2. 一种特异性结合人TSLP的表位的分子, 其中所述表位包含以下残基中的至少一个: SEQ ID NO:38的Lys38、Ala41、Leu44、Ser45、Thr46、Ser48、Lys49、Ile52、Thr53、Ser56、Gly57、Thr58、Lys59、Lys101、Gln145及Arg149。

3. 如技术方案2所述的分子, 其中所述表位包含SEQ ID NO:38的以下各组残基中的至少一组:

- (a) Lys49及Ile52,
- (b) Gly57及Lys59,
- (c) Lys101,
- (d) Gln145及Arg149。

4. 如技术方案1至3中任一项所述的分子, 其中所述分子为单克隆抗体。

5. 如技术方案1至3中任一项所述的分子, 其中所述分子为选自Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、微型抗体或双抗体的抗体片段。

6. 如技术方案1至3中任一项所述的分子, 其中所述分子为Fab。

7. 如技术方案6所述的分子, 其中所述分子为人或人源化Fab。

8. 如技术方案1至4中任一项所述的分子, 其中所述分子为人免疫球蛋白。

9. 如技术方案1至8中任一项所述的分子, 其中所述分子以小于100pM的解离常数(K_D) 结合人TSLP。

10. 如技术方案1至8中任一项所述的分子, 其中所述分子以小于10pM的解离常数(K_D) 结合人TSLP。

11. 一种药物组合物, 其包含如技术方案1至10中任一项所述的分子及至少一种药学上可接受的赋形剂。

12. 如技术方案11所述的药物组合物, 其中所述分子为所述组合物的约5%至约95%、或约10%至约90%、或约15%至约85%、或约20%至约80%、或约25%至约75%、或约30%至约70%、或约40%至约60%、或约40-50% (w/w)。

13. 如技术方案11所述的药物组合物, 其中所述组合物包含壳形成剂。

14. 如技术方案13所述的药物组合物, 其中所述壳形成剂为三亮氨酸或亮氨酸。

15. 如技术方案14所述的药物组合物, 其中所述三亮氨酸或亮氨酸为所述组合物

的约10-75% (w/w)。

16. 如技术方案15所述的药物组合物, 其中所述三亮氨酸为所述组合物的约10-30% (w/w), 或其中所述亮氨酸为所述组合物的约50-75% (w/w)。

17. 如技术方案11所述的药物组合物, 其中所述组合物包含至少一种玻璃形成赋形剂。

18. 如技术方案17所述的药物组合物, 其中所述至少一种玻璃形成赋形剂选自组氨酸、海藻糖、甘露醇、蔗糖或柠檬酸钠。

19. 如技术方案18所述的药物组合物, 其中所述至少一种玻璃形成赋形剂选自海藻糖或海藻糖与甘露醇的混合物。

20. 如技术方案17所述的药物组合物, 其中所述玻璃形成赋形剂为所述组合物的约15-35% (w/w)。

21. 如技术方案11所述的药物组合物, 其中所述组合物包含缓冲液。

22. 如技术方案21所述的药物组合物, 其中所述缓冲液选自组氨酸、甘氨酸、乙酸盐或磷酸盐缓冲液。

23. 如技术方案21所述的药物组合物, 其中所述缓冲液为所述组合物的约5-13%。

24. 如技术方案11所述的药物组合物, 其中所述组合物配制为干粉制剂。

25. 如技术方案24所述的药物组合物, 其中所述组合物配制为适于吸入的干粉制剂。

26. 如技术方案11所述的药物组合物, 其中所述组合物包含: 包含壳及核心的喷雾干燥颗粒, 其中所述壳包含三亮氨酸或亮氨酸, 且所述核心包含: i) 分子、海藻糖、甘露醇及缓冲液; 或 ii) 分子、海藻糖、缓冲液及HCl。

27. 如技术方案26所述的药物组合物, 其中所述缓冲液选自组氨酸、甘氨酸、乙酸盐或磷酸盐缓冲液。

28. 一种包含喷雾干燥颗粒的药物组合物, 所述喷雾干燥颗粒包含:

i) 包含海藻糖、甘露醇、组氨酸及TSLP结合分子的核心, 或包含海藻糖、组氨酸、HCl及TSLP结合分子的核心, 其中所述TSLP结合分子为抗体Fab片段, 其包含:

a) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:4的HCDR1;

包含氨基酸序列SEQ ID NO:2的HCDR2;

包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的HCDR3;

包含氨基酸序列SEQ ID NO:11的LCDR1;

包含氨基酸序列SEQ ID NO:12的LCDR2; 及

包含氨基酸序列SEQ ID NO:13的LCDR3;

或

b) 包含氨基酸序列SEQ ID NO:5的HCDR1;

包含氨基酸序列SEQ ID NO:6的HCDR2;

包含氨基酸序列SEQ ID NO:3的HCDR3;

包含氨基酸序列SEQ ID NO:14的LCDR1;

包含氨基酸序列SEQ ID NO:15的LCDR2; 及

包含氨基酸序列SEQ ID NO:16的LCDR3;

及

ii) 包含三亮氨酸或亮氨酸的壳。

29. 如技术方案28所述的药物组合物, 其包含:

a) 40% (w/w) TSLP结合分子、25% (w/w) 三亮氨酸、30% (w/w) 组合重量的海藻糖与甘露醇, 及5% (w/w) 组氨酸;

b) 50% (w/w) TSLP结合分子、15% (w/w) 三亮氨酸、2.6% (w/w) HCl、5.6% (w/w) 组氨酸, 及26.8% (w/w) 组合重量的海藻糖与碱; 或

c) 50% (w/w) TSLP结合分子、15% (w/w) 三亮氨酸、19.4% (w/w) 海藻糖、13.04% (w/w) 组氨酸及2.56% (w/w) HCl。

30. 一种试剂盒, 其包含如技术方案1所述的分子或如技术方案11所述的药物组合物及用于向受试者递送所述分子或药物组合物的装置。

31. 如技术方案30所述的试剂盒, 其中所述装置递送呈雾化形式的分子或药物组合物。

32. 如技术方案30所述的试剂盒, 其中所述装置为干粉吸入器。

33. 一种治疗有需要受试者的TSLP相关病症的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的如技术方案1至10中任一项所述的分子或如技术方案11至29中任一项所述的药物组合物。

34. 如技术方案1至10中任一项所述的分子或如技术方案11至29中任一项所述的药物组合物, 用于治疗有需要受试者的TSLP相关病症。

35. 如技术方案1至10中任一项所述的分子或如技术方案11至29中任一项所述的药物组合物用于治疗有需要受试者的TSLP相关病症的用途。

36. 如技术方案1至10中任一项所述的分子用于制备用于治疗有需要受试者的TSLP相关病症的药物的用途。

37. 如技术方案33所述的方法、如技术方案34所述的分子或如技术方案35或36所述的用途, 其中TSLP相关炎症病症选自哮喘、慢性阻塞性肺病、过敏性鼻炎、过敏性鼻炎、过敏性鼻炎、嗜酸性粒细胞性食道炎及特应性皮炎。

38. 如技术方案33所述的方法、如技术方案34所述的分子或如技术方案35或36所述的用途, 其中TSLP相关炎症病症为哮喘。

39. 如技术方案33所述的方法、如技术方案34所述的分子或如技术方案35或36所述的用途, 其中所述分子配制为适于吸入的干粉制剂。

40. 如技术方案33所述的方法、如技术方案34所述的分子或如技术方案35或36所述的用途, 其中所述分子经口或鼻内施用给所述受试者。

41. 如技术方案33所述的方法、如技术方案34所述的分子或如技术方案35或36所述的用途, 其中所述分子以雾化形式施用给所述受试者。

42. 如技术方案33所述的方法、如技术方案34所述的分子或如技术方案35或36所述的用途, 其中所述分子通过干粉吸入器施用给所述受试者。

43. 如技术方案33所述的方法、如技术方案34所述的分子或如技术方案35或36所述的用途, 其中所述受试者为人。

44. 如技术方案33所述的方法、如技术方案34所述的分子或如技术方案35或36所

述的用途,其另外包含向所述受试者施用第二药物。

45.如技术方案44所述的方法、分子或用途,其中所述第二药物选自:皮质类固醇、支气管扩张剂、抗组织胺、抗白三烯及PDE-4抑制剂。

46.一种核酸,其编码如技术方案1至10中任一项所述的分子。

47.一种载体,其包含如技术方案46所述的核酸。

48.一种宿主细胞,其包含如技术方案46所述的核酸或如技术方案47所述的载体。

49.一种产生如技术方案1至10中任一项所述的分子的方法,所述方法包含:培养表达编码所述分子的核酸的宿主细胞;及自培养基收集所述分子。

50.一种用于制备包含如技术方案1至10中任一项所述的分子的干粉制剂的方法,所述方法包含:

(a) 提供包含如技术方案1至10中任一项所述的分子、三亮氨酸或亮氨酸、玻璃形成赋形剂及缓冲液的水性溶液;

(b) 在约120℃至约200℃(入口)范围及55℃至约75℃(出口)范围的温度下喷雾干燥步骤(a)的水性溶液以产生干粉颗粒;及

(c) 收集所述干粉颗粒。

51.如技术方案50所述的方法,其中所述缓冲液选自组氨酸、甘氨酸、乙酸盐或磷酸盐缓冲液。

52.如技术方案50所述的方法,其中所述玻璃形成赋形剂选自组氨酸、组氨酸HCl、海藻糖、甘露醇、蔗糖或柠檬酸钠。

如技术方案11所述的药物组合物,其中赋形剂:分子质量比大于0.5。

序列表

<110> 诺华股份有限公司
<120> 胸腺基质淋巴细胞生成素 (TSLP) - 结合分子及该分子的使用方法
<130> PAT057035-CN-DIV
<140>
<141>
<150> 62/342,511
<151> 2016-05-27
<150> 62/216,050
<151> 2015-09-09
<160> 43
<170> PatentIn版本 3.5
<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 1
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met His
1 5 10
<210> 2
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 2
His Ile Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15
Val Lys Gly
<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 3
Glu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ser
1 5
<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 4
Asp Tyr Trp Met His
1 5
<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 5
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
1 5
<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 6
Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr
1 5
<210> 7
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 7

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

<210> 8

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 8

gaggttcagc	tggtggaatc	aggcggcgga	ctggttaagc	ctggcggtag	ccttagactt	60
agctgcgctg	ctagtggctt	caccttttagc	gactactgga	tgactgggt	tagacaggcc	120
cctggtaaag	gcttggagtg	ggtcggacac	attaagtcta	agaccgacgc	cggcactacc	180
gactacgccg	ctcccgttaa	gggccggttc	actatctcta	gggacgactc	taagaacacc	240
ctctaccttc	aaatgaatag	ccttaagacc	gaggacaccg	ccgtctacta	ctgcgctaga	300
gaaatctact	actacgcctt	cgatagctgg	ggtcaaggca	ccctcgtgac	cgtgtctagc	360

<210> 9

<211> 450

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述:合成的多肽"

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr			
	20	25	30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Gly His Ile Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala			
	50	55	60
Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr			
65	70	75	80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
	85	90	95
Tyr Cys Ala Arg Glu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln			
	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val			
	115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala			
	130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser			
145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val			
	165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro			
	180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys			
	195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp			
	210	215	220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
	245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
	260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
	275	280	285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg	
290	295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys	
305	310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu	
	325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr	
	340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu	
	355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp	
	370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val	
385	390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp	
	405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His	
	420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	
	435 440 445

Gly Lys

450

<210> 10

<211> 1350

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 10

gaggttcagc tgggtgaatc aggcggcgga ctggttaagc ctggcggtag ccttagactt	60
agctgcgctg ctagtggtt cacttttagc gactactgga tgcactgggt tagacaggcc	120
cctggtaaaag gcttggagtg ggtcggacac attaatgcta agaccgacgc cggcactacc	180
gactacgccg ctcccgttaa gggccggttc actatctcta gggacgactc taagaacacc	240
ctctaccttc aaatgaatag ccttaagacc gaggacaccg ccgtctacta ctgcgctaga	300
gaaatctact actacgcctt cgatagctgg ggtcaaggca ccctcgtgac cgtgtctagc	360
gctagcacta agggcccaag tgtgtttccc ctggcccca gcagcaagtc tacttccggc	420
ggaactgctg ccctgggttg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gacagtgtcc	480
tggaactctg gggctctgac ttccggcgtg cacaccttcc ccgccgtgct gcagagcagc	540

```

ggcctgtaca gcctgagcag cgtggtgaca gtgccctcca gctctctggg aaccagacc 600
tatatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agtggagccc 660
aagagctgcg acaagaccca cacctgcccc ccctgcccag ctccagaact gctgggaggg 720
ccttccgtgt tcctgttccc ccccaagccc aaggacaccc tgatgatcag caggaccccc 780
gaggtgacct gcgtgggtgt ggacgtgtcc cagaggacc cagagtgaa gttcaactgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ccagagagga gcagtacaac 900
agcacctaca ggggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 960
gaatacaagt gcaaagtctc caacaaggcc ctgccagccc caatcgaaaa gacaatcagc 1020
aaggccaagg gccagccacg ggagccccag gtgtacaccc tgccccccag ccgggaggag 1080
atgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtgaagg gcttctaccc cagcgatatc 1140
gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac cccccagtg 1200
ctggacacg acggcagctt cttcctgtac agcaagctga ccgtggacaa gtccaggtgg 1260
cagcagggca acgtgttcag ctgcagcgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
cagaagtccc tgagcctgag ccccggaag 1350

```

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 11

Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr Val His

1 5 10

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 12

Gly Asp Asn Glu Arg Pro Ser

1 5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 13
Gln Ala Ala Asp Trp Val Asp Phe Tyr Val
1 5 10
<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 14
Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr
1 5
<210> 15
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 15
Gly Asp Asn
1
<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 16
Ala Asp Trp Val Asp Phe Tyr
1 5
<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 17

Ser	Tyr	Glu	Leu	Thr	Gln	Pro	Leu	Ser	Val	Ser	Val	Ala	Leu	Gly	Gln
1				5				10					15		
Thr	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Tyr	Val
			20				25					30			
His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
		35				40					45				
Gly	Asp	Asn	Glu	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55				60					
Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Ala	Gln	Ala	Gly
65				70				75					80		
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Trp	Val	Asp	Phe	Tyr
			85				90					95			
Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu					
			100				105								

<210> 18

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 18

agctacgagc	tgactcagcc	ccttagcggt	agcgtggccc	tgggtcaaac	cgctagaatc	60
acctgtagcg	gcgataatat	cggtctctaaa	tacgttcact	ggtatcagca	gaagcccgg	120
caagcccccg	tgctcgtgat	ctacggcgat	aacgagcggc	ctagcggaat	ccccgagcgg	180
tttagcggct	ctaatacgcg	taacaccgct	acctgacta	tctctagggc	tcaggccggc	240
gacgaggccg	actactactg	tcaggccgcc	gactgggtgg	acttctacgt	gttcggcgga	300
ggcactaagc	tgaccgtgct	g				321

<210> 19

<211> 213

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 20

<211> 639

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 20

agctacgagc tgactcagcc ccttagcggt agcgtggccc tgggtcaaac cgctagaatc 60

acctgtagcg gcgataatat cggctctaaa tacgttcact ggtatcagca gaagcccgggt 120

caagcccccg tgctcgtgat ctacggcgat aacgagcggc ctagcggaat ccccgagcgg 180
 ttttagcggct ctaatagcgg taacaccgct accctgacta tctctagggc tcaggccggc 240
 gacgaggccg actactactg tcaggccgcc gactgggtgg acttctacgt gttcggcgga 300
 ggcactaagc tgaccgtgct gggtaacct aaggctgccc ccagcgtgac cctgttcccc 360
 cccagcagcg aggagctgca ggccaacaag gccaccctgg tgtgcctgat cagcgacttc 420
 taccagggcg ccgtgaccgt ggcctggaag gccgacagca gccccgtgaa ggccggcgtg 480
 gagaccacca cccccagcaa gcagagcaac aacaagtacg ccgccagcag ctacctgagc 540
 ctgacccccg agcagtggaa gagccacagg tcctacagct gccaggtgac ccacgagggc 600
 agcacctgtg aaaagaccgt ggccccaacc gagtgcagc 639

<210> 21

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 21

gaggtgcagc tgggtggaatc aggcggcgga ctggtcaagc ctggcggtag cctgagactg 60
 agctgcgctg ctagtggcctt caccttttagc gactactgga tgcactgggt cagacaggcc 120
 cctggtaaag gcctggagtg ggtcggacac attaagtcta agaccgacgc cggcactacc 180
 gactacgccg ctctctgtgaa gggccggttc actatctcta gggacgactc taagaacacc 240
 ctgtacctgc agatgaatag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtctacta ctgcgctaga 300
 gagatctact actacgcctt cgatagctgg ggtcagggca ccctggtcac cgtgtctagc 360

<210> 22

<211> 223

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 22

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly His Ile Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr	
65	70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr	
	85 90 95
Tyr Cys Ala Arg Glu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln	
	100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val	
	115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala	
	130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser	
145	150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val	
	165 170 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro	
	180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys	
	195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys	
	210 215 220

<210> 23

<211> 669

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 23

gaggtgcagc tgggtgaatc aggcggcgga ctggtcaagc ctggcggtag cctgagactg	60
agctgcgctg ctagtggcctt caccttttagc gactactgga tgcactgggt cagacaggcc	120
cctggtaaaag gcctggagtg ggtcggacac attaagtcta agaccgacgc cggcactacc	180
gactacgccg ctccctgtgaa gggccggttc actatctcta gggacgactc taagaacacc	240
ctgtacctgc agatgaatag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtctacta ctgcgctaga	300
gagatctact actacgcctt cgatagctgg ggtcagggca ccctggtcac cgtgtctage	360
gctagcacta agggccccctc cgtgttcctt ctggccccctt ccagcaagtc tacctctggc	420
ggcaccgctg ctctgggctg cctgggtgaag gactacttcc ctgagcctgt gacagtgtcc	480
tggaaactctg gcgccctgac ctccggcgctg cacaccttcc ctgccgtgct gcagtctcc	540
ggcctgtact ccctgtcctc cgtgggtgaca gtgccttccct ccagcctggg caccagacc	600
tatatctgca acgtgaacca caagccttcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggagcct	660

aagtcatgc	669
<210> 24	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"	
<400> 24	
agctacgagc tgactcagcc cctgagcgtc agcgtggccc tgggtcagac cgctagaatc	60
acctgtagcg gcgataatat cggtctctaaa tacgtgcact ggtatcagca gaagcccggg	120
caggcccccg tgctggtgat ctacggcgat aacgagcggc ctagcggaat ccccgagcgg	180
tttagcggct ctaatagcgg taacaccgct accctgacta tctctagggc tcaggccggc	240
gacgaggccg actactactg tcaggccgcc gactgggtgg acttctacgt gttcggcgga	300
ggcactaagc tgaccgtgct g	321
<210> 25	
<211> 213	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 来源	
<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"	
<400> 25	
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Leu Ser Val Ser Val Ala Leu Gly Gln	
1 5 10 15	
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr Val	
20 25 30	
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr	
35 40 45	
Gly Asp Asn Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser	
50 55 60	
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Ala Gln Ala Gly	
65 70 75 80	
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Ala Asp Trp Val Asp Phe Tyr	
85 90 95	
Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala	
100 105 110	
Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala	
115 120 125	

Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala
 130 135 140
 Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val
 145 150 155 160
 Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser
 165 170 175
 Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr
 180 185 190
 Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala
 195 200 205
 Pro Thr Glu Cys Ser
 210

<210> 26

<211> 639

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 26

```

agctacgagc tgactcagcc cctgagcgtc agcgtggccc tgggtcagac cgctagaatc      60
acctgtagcg gcgataatat cggctctaaa tacgtgcact ggtatcagca gaagcccgggt      120
caggcccccg tgctggtgat ctacggcgat aacgagcggc ctagcggaat ccccgagcgg      180
tttagcggct ctaatagcgg taacaccgct accctgacta tctctagggc tcaggccggc      240
gacgaggccg actactactg tcaggccgcc gactgggtgg acttctacgt gttcggcgga      300
ggcactaagc tgaccgtgct gggtcagcct aaggctgccc ccagcgtgac cctgttcccc      360
cccagcagcg aggagctgca ggccaacaag gccaccctgg tgtgcctgat cagcgacttc      420
taccagggcg ccgtgaccgt ggcctggaag gccacagca gccccgtgaa ggccggcgtg      480
gagaccacca ccccgagcaa gcagagcaac aacaagtacg ccgccagcag ctacctgagc      540
ctgacccccg agcagtggaa gagccacagg tctacagct gccaggtgac ccacgagggc      600
agcaccgtgg aaaagaccgt ggccccaacc gagtgcagc      639

```

<210> 27

<211> 159

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 27

Met Phe Pro Phe Ala Leu Leu Tyr Val Leu Ser Val Ser Phe Arg Lys
 1 5 10 15
 Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asp Phe Thr

20	25	30
Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Thr Ile Ser		
35	40	45
Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser Thr Glu Phe Asn		
50	55	60
Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu Thr Glu Ile Gln		
65	70	75
Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser Leu Ala Lys Glu		
85	90	95
Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly		
100	105	110
Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Arg Arg		
115	120	125
Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu		
130	135	140
Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln		
145	150	155
<210> 28		
<211> 2629		
<212> DNA		
<213> 智人		
<400> 28		
gcagccagaa agctctggag catcaggag actccaactt aaggcaacag catgggtgaa	60	
taagggcttc ctgtggactg gcaatgagag gcaaacctg gtgcttgagc actggcccct	120	
aaggcaggcc ttacagatct cttacactcg tgggtgggaag agtttagtgt gaaactgggg	180	
tggaattggg tgtccacgta tgttcccttt tgccttacta tatgttctgt cagtttcttt	240	
caggaaaatc ttcattctac aacttgtagg gctgggtgta acttacgact tctaactg	300	
tgactttgag aagattaaag cagcctatct cagtactatt tctaaagacc tgattacata	360	
tatgagtggg accaaaagta ccgagttcaa caacaccgtc tctttagtca atcggccaca	420	
ttgccttact gaaatccaga gcctaaccct caatcccacc gccggctgcg cgtcgctcgc	480	
caaagaaatg ttcgccatga aaactaaggc tgccttagct atctggtgcc caggctattc	540	
ggaaaactcag ataaatgcta ctcaggcaat gaagaagagg agaaaaagga aagtcacaac	600	
caataaatgt ctggaacaag tgtcacaatt acaaggattg tggcgctcgt tcaatcgacc	660	
tttactgaaa caacagtaaa ccatctttat tatggtcata ttacacagca ccaaaataaa	720	
tcatctttat taagtagatg aaacattaac tctaactgtg acaaagaaga ccacaaatag	780	
ttatctttta attacagaag agtttcttaa cttacttttg taagttttta ttgtgtaagt	840	
ttataatgca ggggaagtac tactcctcaa atgttgaggg aagcttccat aacattgatg	900	
actggcttca tggcagtaat tctcggtgtg agttgcataa gcattgctca agaggaaaat	960	
ccaaaagtgc agcaggagaa ctcttttccc tgaaaaagga aaaatattga actcaatgat	1020	

```

agcacctaaa cttacattta aaagacagac attccttcta catgtaatga cacttcttgt 1080
gttaaactaa aaattttacaa gagaagaaaag tgaaagcaaa tgggggtttca caaatagttg 1140
taaatatagt gaagcaattt gaaataattt tcaagcaaag tattgtgaaa gtattctaag 1200
ccaagtttta aatattatct aacagacaag agtgggtatat acaagtagat cctgagaagt 1260
acctttgtta cagctactat aaatatacat ataaattata gaatctactt taattttatt 1320
tgtgaacact tttgaaaatg tacatgttcc tttgtaattg aactatata tttcttaata 1380
aaataattct caaatttgtt tcttatgaat catctctcaa atctagttag acaatttgca 1440
cacatacttt tctaaggac attatcttcc ttcaggtttt tacctccact catccttaga 1500
gcccactgac tgctccccct tatacctgtt ggccctgcct ataggagaga atatttgag 1560
ataggcagct tcaggatgca ttgcaatcat ctttttctta aattatgtca ctagtctttt 1620
attttttccc ctcttgaact ttctcacac ctggaagaaa caaagtagga aaaagtgaac 1680
aggggatgtc aaatcgattc ttgaattccc gctgcaagct agagccgcag gcaccctctc 1740
actcaatttc cactcagaac cctataaaca ccagtgggaa gggcaacca ctgcacgtgg 1800
gaatgcactg atttttccta ggagtagaca tgttctctta attactccct gagggtagt 1860
tggggctaaa ccatgacaga agtggggaag ttcaatgtcc ttaaatccat cttacttgcc 1920
aacaggtaag aggaagctta cattacatgt ccagtccaca tttaaagagc acttactgtg 1980
gaacaagcct tcagccaaac aatggggata gaaaagtagg taagactcag cttttgtcca 2040
gagaagctca gggtagct gaataggcag tttcttttgt cctgaggaaa atcaggacat 2100
gcctgctttc taaaaatctt cctctgaaga cctgacccaa gctcttaaat gctattgtaa 2160
gagaaatttc tttgtctatt aactccattt tagtaggat tctactgacta gattttactg 2220
aactatgaaa ataaatacac ataattttt acaaaatttt gggcccaatt cccctaaaag 2280
aattgaggat tagggagaaa ggagacaact caaagtcac ccattaagt cagtttcttt 2340
gaatcttctg ctttatcttt aaaaatttgt ataatttata tttttattc tatgtgttcc 2400
atagatatct taatgtaaaa ttagtcattt aaattacact gtcaattaaa agtaatgggc 2460
aagagattgc atcatactaa tttagtaaga acgttcccaa atgttgtaac aatgtggatc 2520
atacatctct ggttttttta atgtattgag gctttcttgg tggactagta tagtatacgg 2580
tcagttatgt caatgtttca tggtaataa aaaggaagtt gcaaattgt 2629

```

<210> 29

<211> 63

<212> PRT

<213> 智人

<400> 29

Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly

1 5 10 15

Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Arg Arg

20 25 30

Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu

35 40 45

Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln

50	55	60	
<210> 30			
<211> 2411			
<212> DNA			
<213> 智人			
<400> 30			
accctcgcca cgccccctgct cccccgcggt tggttcttcc ttgctctact caaccctgac		60	
ctctttctctc tgactctcga cttgtgttcc ccgtcctcc ctgaccttcc tccccctccc		120	
tttcaactcaa ttctcaccaa ctctttctct ctctgggtgtt ttctcctttt ctcgtaaact		180	
ttgccgccta tgagcagcca cattgcetta ctgaaatcca gaggcctaacc ttcaatccca		240	
ccgccggctg cgcgtcgtc gccaaagaaa tgttcgccaat gaaaactaag gctgccttag		300	
ctatctgggtg cccaggttat tcggaaactc agataaatgc tactcaggca atgaagaaga		360	
ggagaaaaaag gaaagtcaca accaataaat gtctggaaca agtgtcaca ttacaaggat		420	
tgtggcgctc cttcaatcga cttttactga aacaacagta aaccatcttt attatggtca		480	
tatttcacag caccaaaaata aatcatcttt attaagtaga tgaaacatta actctaactg		540	
tgacaaagaa gaccacaaat agttatcttt taattacaga agagtttctt aacttacttt		600	
tgtaatgttt tattgtgtaa gtttataatg caggggaagt actactcctc aaatgttgag		660	
ggaagcttcc ataacattga tgactggctt catggcagta attctcggct gtagttgcat		720	
aagcattgct caagaggaaa atccaaaagt gcagcaggag aactcttttc cctgaaaaag		780	
gaaaaatatt gaactcaatg atagcaccta aacttacatt taaaagacag acattccttc		840	
tacatgtaat gacacttctt gtgttaaact aaaaatttac aagagaagaa agtgaaagca		900	
aatgggggtt cacaaatagt tgtaaataata gtgaagcaat ttgaaataat tttcaagcaa		960	
agtattgtga aagtattcta agccaagttt taaatattat ctaacagaca agagtggat		1020	
atacaagtag atcctgagaa gtacctttgt tacagctact ataaatatac atataaatta		1080	
tagaatctac ttttaatttat tttgtgaaca cttttgaaaa tgtacatgtt cttttgtaat		1140	
tgacactata tatttcttaa taaaataatt ctcaaatttg tttcttatga atcatctctc		1200	
aaatctagtt agacaatttg cacacatact tttctaaggg acattatctt ctttcaggtt		1260	
tttacctcca ctcatcctta gagcccaactg actgctcccc ttataacctg ttggccctgc		1320	
ctataggaga gaatatttgg agataggcag cttcaggatg cattgcaatc atccttttct		1380	
taaattatgt cactagtctt ttattttttc ccctcttgaa ctttcctcac acctggaaga		1440	
aacaaagtag gaaaaagtga acaggggatg tcaaatcgat tcttgaattc ccgctgcaag		1500	
ctagagccgc aggcaccctc tcaactcaatt tccactcaga accctataaa caccagtggg		1560	
aagggaacc cactgcacgt gggaatgcac tgatttttcc taggagtaga catgttcctc		1620	
taattactcc ctgagggtta gttggggcta aaccatgaca gaagtgggga agttcaatgt		1680	
ccttaaatecc atcttacttg ccaacaggta agaggaagct tacattacat gtccagtcca		1740	
catttaaaga gcacttactg tggaacaagc cttcagccaa acaatgggga tagaaaagta		1800	
ggtaagactc agcctttgtc cagagaagct cagggtatag ctgaataggc agtttctttt		1860	
gtcctgagga aaatcaggac atgcctgctt tctaaaaatc ttcctctgaa gacctgacct		1920	
aagctcttaa atgctattgt aagagaaatt tctttgtcta ttaactccat tttagtaggg		1980	

attcactgac tagattttac tgaactatga aaataaatac acataatttt tcacaaaatt 2040
 ttgggcccaa ttccccctaaa agaattgagg attagggaga aaggagacaa ctcaaagtca 2100
 tcccattaag tgcagtttct ttgaatcttc tgctttatct ttaaaaattt gtataattta 2160
 tatattttat tctatgtgtt ccatagatat cttaatgtaa aattagtcatt ttaaattaca 2220
 ctgtcaatta aaagtaatgg gcaagagatt gcatcactact aatttagtaa gaacgttccc 2280
 aaatgttgta acaatgtgga tcatacatct ctgggttttt aaatgtattg aggctttctt 2340
 ggtggactag tatagtatac ggtcagttat gtcaatgttt catgggtcaat aaaaaggaag 2400
 ttgcaaatgt t 2411

<210> 31

<211> 131

<212> PRT

<213> 食蟹猴(Macaca fascicularis)

<400> 31

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

<210> 32

<211> 393

<212> DNA

<213> 食蟹猴

<400> 32

tacgacttca ccaactgcga cttcgagaag atcgaggccg actacctgag aaccatcagc 60
 aaggacctga tcacctacat gagcggcacc aagagcaccg acttcaacaa caccgtgtcc 120
 tgcagcaaca gacccactg cctgaccgag atccagagcc tgaccttcaa cccaccccc 180

agatgtgcca gcctggccaa agagatgttc gccagaaaga ccaaggccac cctggccctg 240
 tggtgtcccg gctacagcga gacacagatc aacgccacac aggccatgaa gaagcggcgg 300
 aagcggaaaag tgaccaccaa caagtgcctg gaacaggtgt cacagctgct ggggctgtgg 360
 cggcggttca tccggaccct gctgaagaag cag 393

<210> 33

<211> 140

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 33

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

<210> 34

<211> 1143

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 34

cacgttcagg cgacagcatg gttcttctca ggagcctctt catcctgcaa gtactagtag 60
 ggatggggct aacttacaac ttttctaact gcaacttcac gtcaattacg aaaatatatt 120
 gtaacataat ttttcatgac ctgactggag atttgaaagg ggctaagttc gagcaaatec 180
 aggactgtga gagcaagcca gcttgtctcc tgaaaatcga gtactatact ctcaatecta 240
 tccctggctg cccttcactc cccgacaaaa catttgcccg gagaacaaga gaagccctca 300
 atgaccactg cccaggctac cctgaaactg agagaaatga cggtactcag gaaatggcac 360
 aagaagtcca aaacatctgc ctgaatcaaa cctcacaaat tctaagattg tggtattcct 420

tcatgcaatc	tccagaataa	aattagcttt	cagcttctgc	tatgaaaatc	tctatcttgg	480
ttttagtgga	cagaatacta	agggtgtgac	acttagagga	ccactgggtgt	ttattcttta	540
attacagaag	ggattcttaa	cttatttttt	ggcatatcgc	ttttttcagt	ataggtgctt	600
taaatgggaa	atgagcaata	gaccgttaat	ggaaatatct	gtactgttaa	tgaccagctt	660
ctgagaagtc	tttctcacct	cccctgcaca	caccttactc	tagggcaaac	ctaactgtag	720
taggaagaga	attgaaagta	gaaaaaaaaa	attaaaacca	atgacagcat	ctaaaccctg	780
tttaaaaggc	aaggattttt	ctacctgtaa	tgattcttct	aacattccta	tgctaagatt	840
ttaccaaaaga	agaaaaatgac	agttcgggca	gtcactgcc	tgatgaggtg	gtctgaaaga	900
agattgtgga	atctgggaga	aactgctgag	atcatattgc	aatccagct	gtcaaagggt	960
tcagacccag	gacagtacaa	ttcgtgagca	gatctcaaga	gccttgca	tctacgagat	1020
atatatttta	agttgtagat	aatgaatttc	taattttatt	tgtgagcact	tttggaata	1080
tacatgctac	tttgtaatga	atacatttct	gaataaagta	attctcaagt	ttgaaaaaaaa	1140
aaa						1143

<210> 35

<211> 1146

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 35

actcttgcca	ggcacctccc	tcctgtgggt	tgattccgtt	ttcctcttct	caactgactc	60
tggattctga	taccagacac	cttcctgggtg	tctttccctc	ctatcccat	ccccttccct	120
gtccctttca	ttcaattttt	aatatctggc	gggttttttt	tttttttct	ctctctctga	180
actgtgccgc	ttgtgagcag	ccagcttgct	tcctgaaaat	cgagtactat	actctcaatc	240
ctatccctgg	ctgcccttca	ctccccgaca	aaacatttgc	cggagaaca	agagaagccc	300
tcaatgacca	ctgcccaggc	taccctgaaa	ctgagagaaa	tgacgggtact	caggaaatgg	360
cacaagaagt	ccaaaacatc	tgctgaatc	aaacctcaca	aattctaaga	ttgtggtatt	420
ccttcatgca	atctccagaa	taaaattagc	tttcagcttc	tgctatgaaa	atctctatct	480
tggttttagt	ggacagaata	ctaagggtgt	gacacttaga	ggaccactgg	tgttttattct	540
ttaattacag	aagggttct	taacttattt	tttggcatat	cgcttttttc	agtataggtg	600
ctttaaatgg	gaaatgagca	atagaccgtt	aatggaaata	tctgtactgt	taatgaccag	660
cttctgagaa	gtcttttctca	cctccctgc	acacacctta	ctctagggca	aaccttaactg	720
tagtaggaag	agaattgaaa	gtagaaaaaa	aaaattaaaa	ccaatgacag	catctaaacc	780
ctgttttaaaa	ggcaaggatt	tttctacctg	taatgattct	tctaacattc	ctatgctaag	840
atttttacca	agaagaaaaat	gacagttcgg	gcagtcactg	ccatgatgag	gtggtctgaa	900
agaagattgt	ggaatctggg	agaaaactgct	gagatcatat	tgcaaatcca	gctgtcaaag	960
ggttcagacc	caggacagta	caattcgtga	gcagatctca	agagccttgc	acatctacga	1020
gatatatatt	taaagttgta	gataatgaat	ttctaattta	ttttgtgagc	acttttgtaa	1080
atatacatgc	tactttgtaa	tgaatacatt	tctgaataaa	gtaattctca	agtttgaaaa	1140
aaaaaa						1146

<210> 36

<211> 136

<212> PRT

<213> 褐家鼠 (*Rattus norvegicus*)

<400> 36

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

<210> 37

<211> 1125

<212> DNA

<213> 褐家鼠

<400> 37

tcaggcaaca gcatggttct tttcaggtac ctctttatcc tgcaagtggc acggctggca 60
 ctaacttaca actttttctaa ctgtaacttc gagatgattt tgagaatata tcatgcaaca 120
 attttttcgtg acctgcttaa agatttgaat gggatcttgt tcgaccaa at cgaggactgt 180
 gacagcagga cagcttgtct cctgaaaatc gaccaccata ctttcaatcc tgtccctggc 240
 tgcccgtcac tccccgagaa agcgttcgct ttgaaaacga aagcggccct cattaactac 300
 tgcccaggct actctgaaac tgagagaaat ggtactctgg aaatgacacg agaaatcaga 360
 aacatctgcc tgaatcaaac ctcaaaaatt ctaggattgt ggcttttctg cattcaatct 420
 tgaagaaaaa attagctttt ggattatatt atgaaaatat atatcttggt tttagtagat 480
 ataataactaa ggggtgtgaca cttaaaagaa cactaatgtt tattctttta ttatagaagg 540
 gattcttaac ttatttttgg catatcgttg tttagtgtag gcgcttttaa tggaaaatga 600
 gcattacccc tttaatggaa ataaccgtgc tgtaaatgat tggcttcggc ttctgagcag 660
 tctttctcac ctacactgag acactttact ctagggcaaa cctaactgta gtaggaagaa 720

```

aatcaaaagt agaaaaacag ttgaaaccaa tgacaggatc tatactccat ttaaaaggca      780
agaatttttg tacctgtaat gattcttcta acattcctac gctaagattt tactaaagaa      840
gaaaataaca gcagaggaaa gtgttcaggc agtcactgcc atgatgaagc tgtcagaatc      900
tgagagctac tgctgcaact gatcgtgtag taaatccagc tgtaaagggg atcttaaccc      960
accacagtgg gatgcacagg cagatcccca agggcattgt gcagctgtga gatatatatt     1020
taaagtgtga tataatgatt ttctaattta ttccgtgagc acctttgaaa atatacatgt     1080
cgctgtgtaa caaatacact tctgaataaa gtaattctca agttc                       1125

```

<210> 38

<211> 149

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 38

Met Gly Ser Ser His His His His His His Leu Glu Val Leu Phe Gln

1 5 10 15

Gly Pro Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala

20 25 30

Tyr Leu Ser Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr

35 40 45

Lys Ser Thr Glu Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Ser Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu

85 90 95

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

100 105 110

Ala Met Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu

115 120 125

Glu Gln Val Ser Gln Leu Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro

130 135 140

Leu Leu Lys Gln Gln

145

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> 来源

<223> /注释="未知的描述：潜在的furin剪切位点"

<400> 39

Arg Arg Lys Arg

1

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的6xHis标签"

<400> 40

His His His His His His

1

5

<210> 41

<211> 131

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 41

Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu

1

5

10

15

Ser Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser

20

25

30

Thr Glu Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu

35

40

45

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

50

55

60

Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile

65

70

75

80

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

85

90

95

Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln

100

105

110

Val Ser Gln Leu Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu

115	120	125
Lys Gln Gln		
130		
<210> 42		
<211> 119		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"		
<400> 42		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly		
1 5 10 15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr		
20 25 30		
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35 40 45		
Gly His Ile Lys Ser Lys Thr Asp Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala		
50 55 60		
Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr		
65 70 75 80		
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr		
85 90 95		
Tyr Cys Ala Arg Glu Ile Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ser Trp Gly Gln		
100 105 110		
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser		
115		
<210> 43		
<211> 109		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<221> 来源		
<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"		
<400> 43		
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Leu Ser Val Ser Val Ala Leu Gly Gln		
1 5 10 15		
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Ser Lys Tyr Val		
20 25 30		

His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Ile	Tyr
35				40				45							
Gly	Asp	Asn	Glu	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
50				55				60							
Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Ala	Gln	Ala	Gly
65				70				75				80			
Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Ala	Asp	Trp	Val	Asp	Phe	Tyr
85				90				95							
Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Gln			
100				105											

```

      *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
EVQLVESGGGLVVKPGGSLRLSCAASGPTFSDYNNHWVRQAPGKGLWVCHIESKTDAGTTDYAAPVK
GRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCAPIRIYYAPDSWGQSTLVTVSSASTKGPSTVPLAPS
SKSTSGCTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSCVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLCTQTY
ICNVNHEPSNTKVDEKVEPKSC (SEQ ID NO: 22)

```

图1A

```

      *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
SYELTQPLSVSVALGQTARITCSGDNIGSKYVHWYQKPGQAPVLIYGDNERPSSGIVERPSSGNSGNTATLTIS
RAQAGDEADYYCQADWYDFYVFGGTLTLVLGQPKAAPSVTLFPPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAMK
ADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSIRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 25)

```

图1B

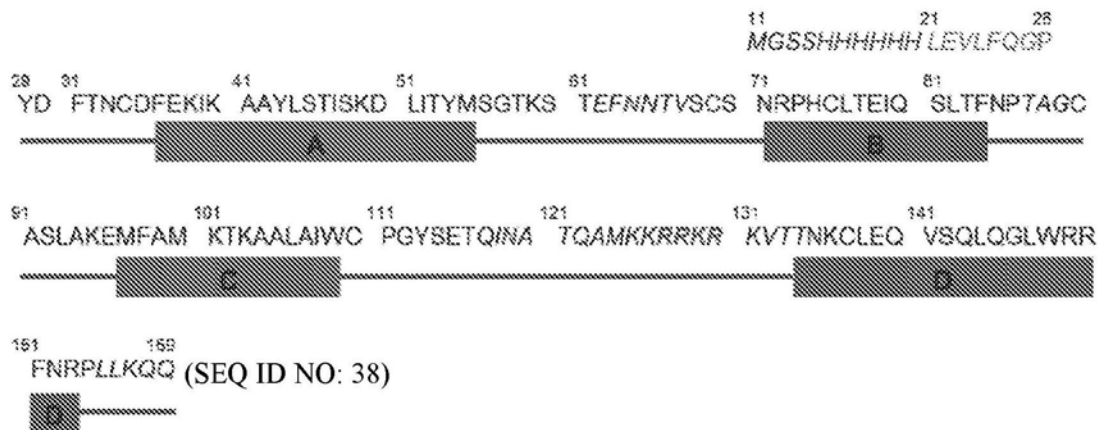


图2

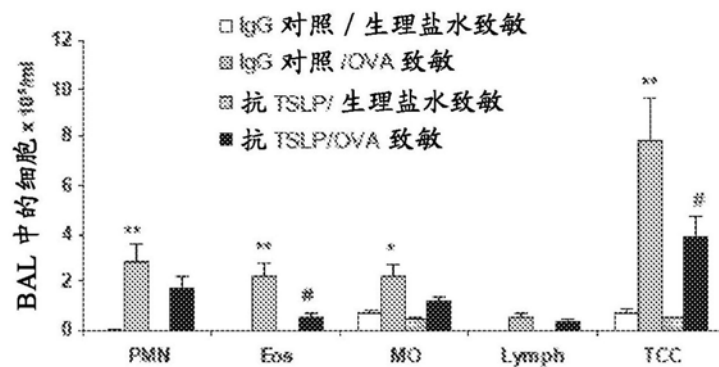


图3

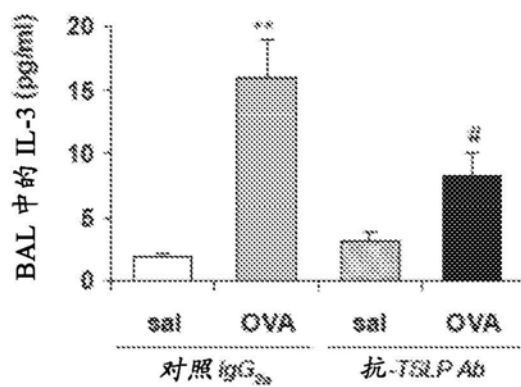


图4A

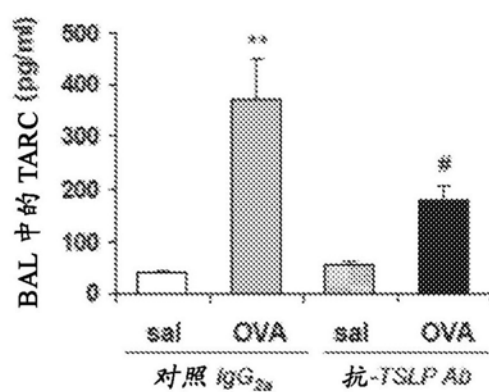


图4B

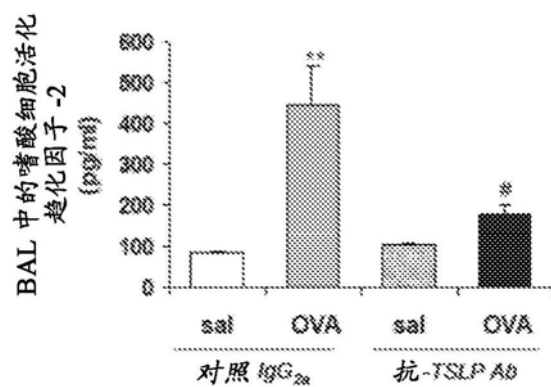


图4C

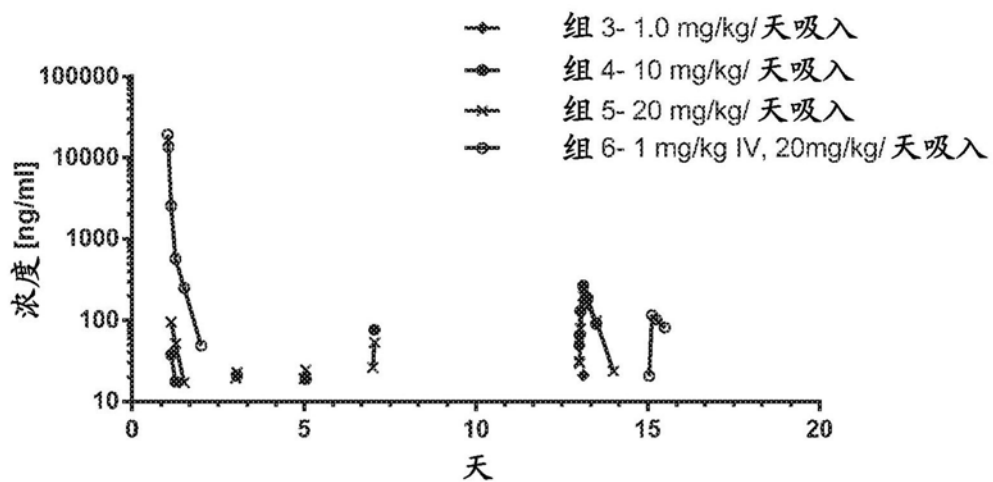


图5

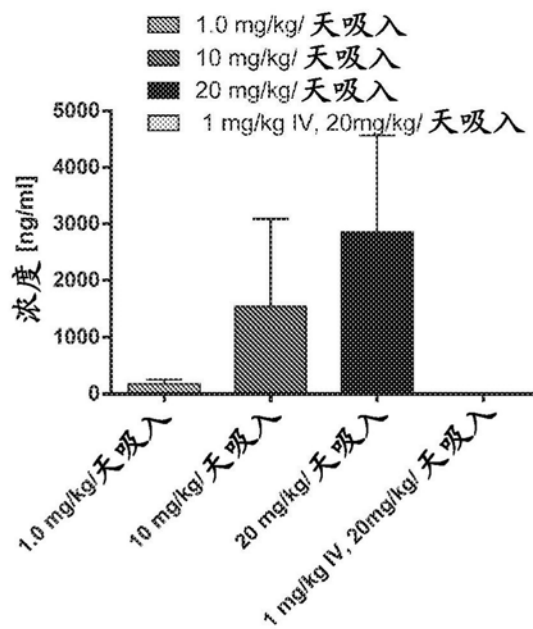


图6A

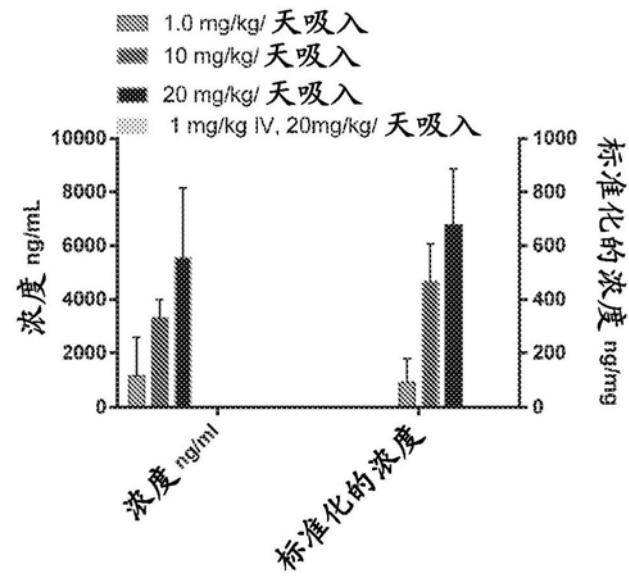


图6B

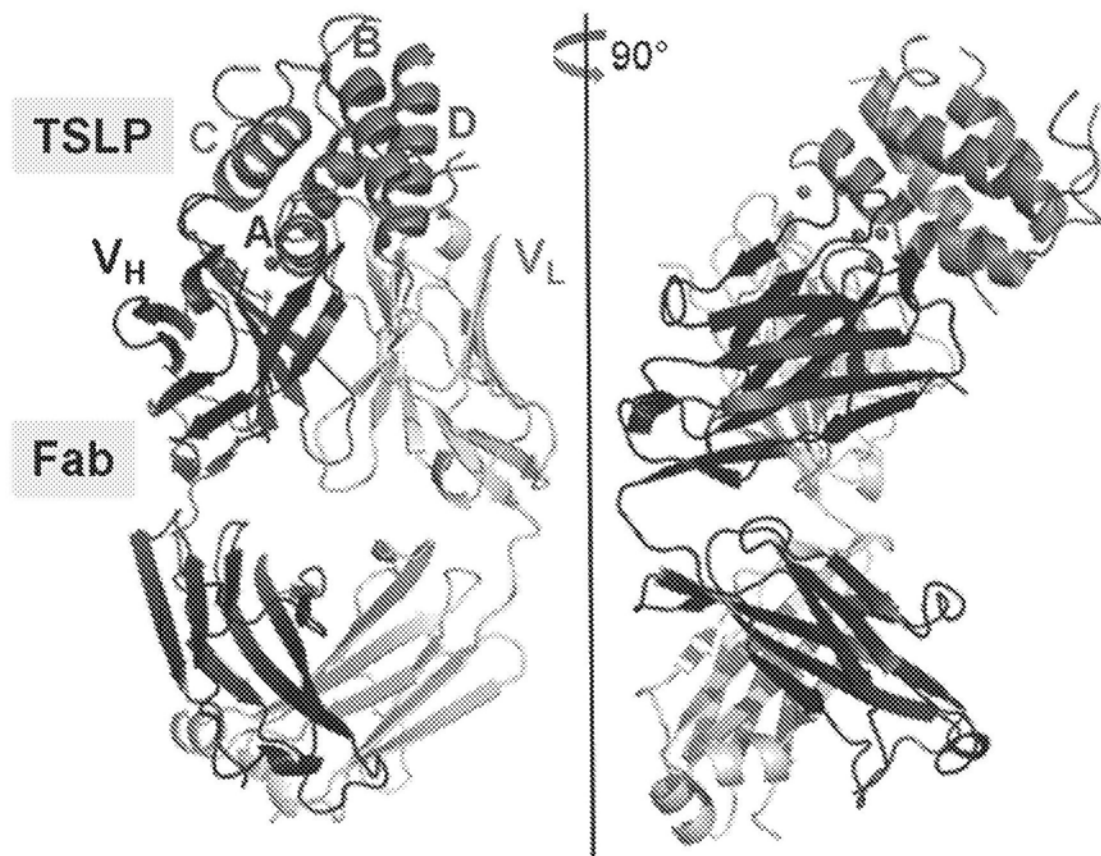


图7

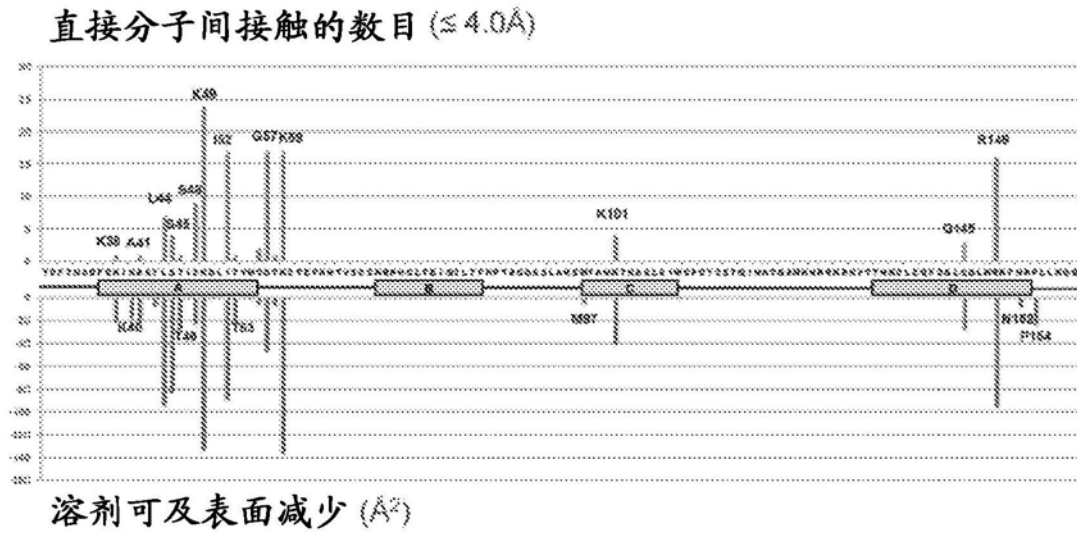


图8

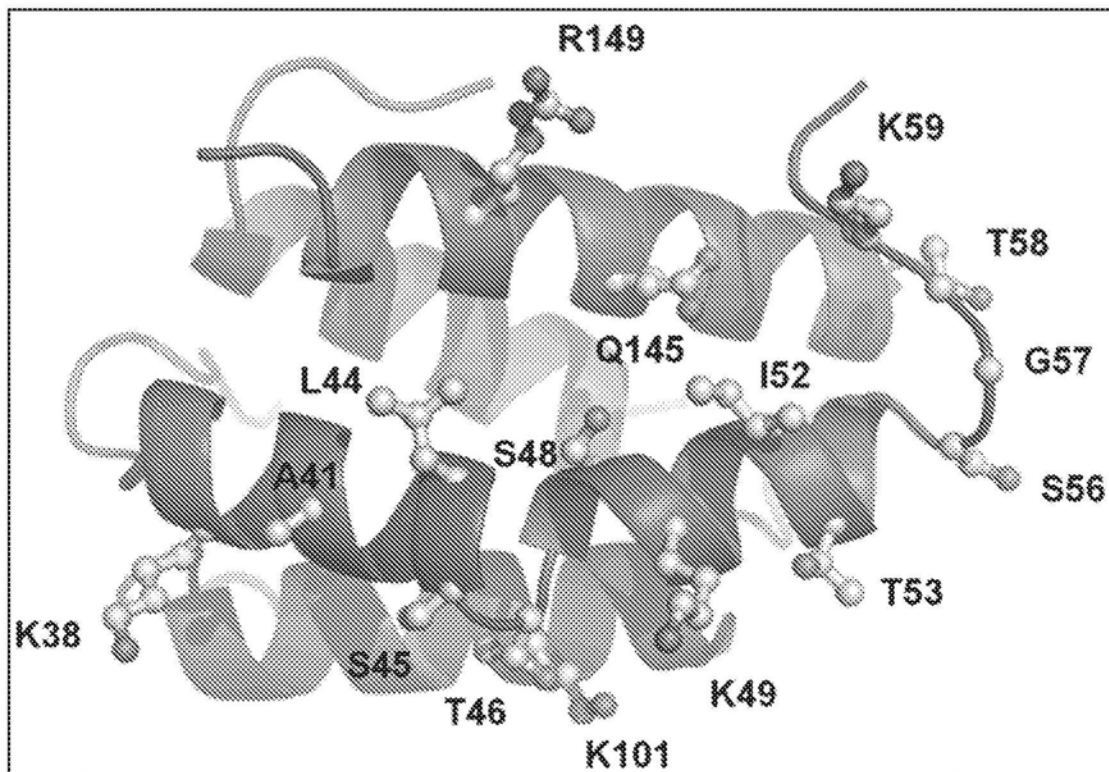


图9

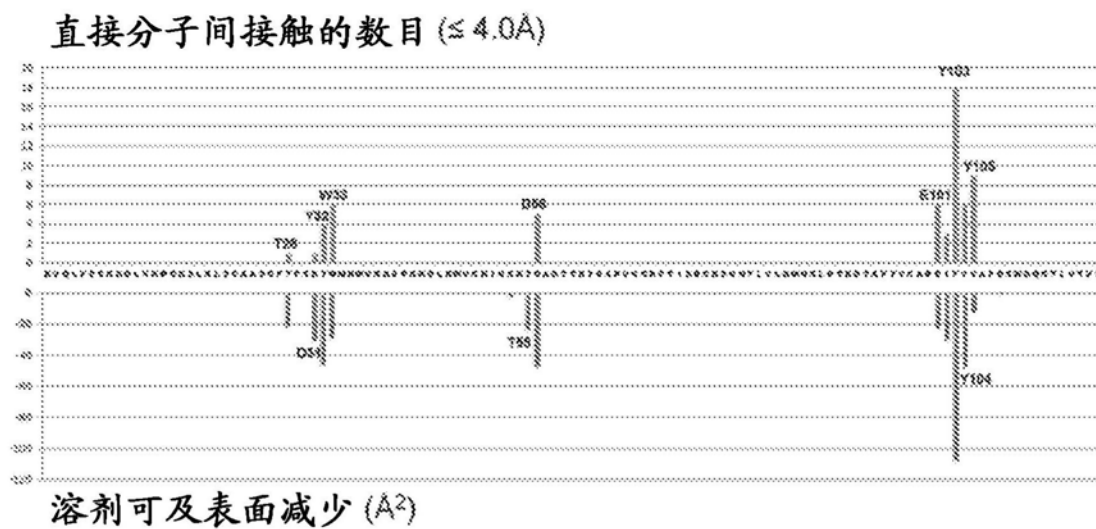


图10A

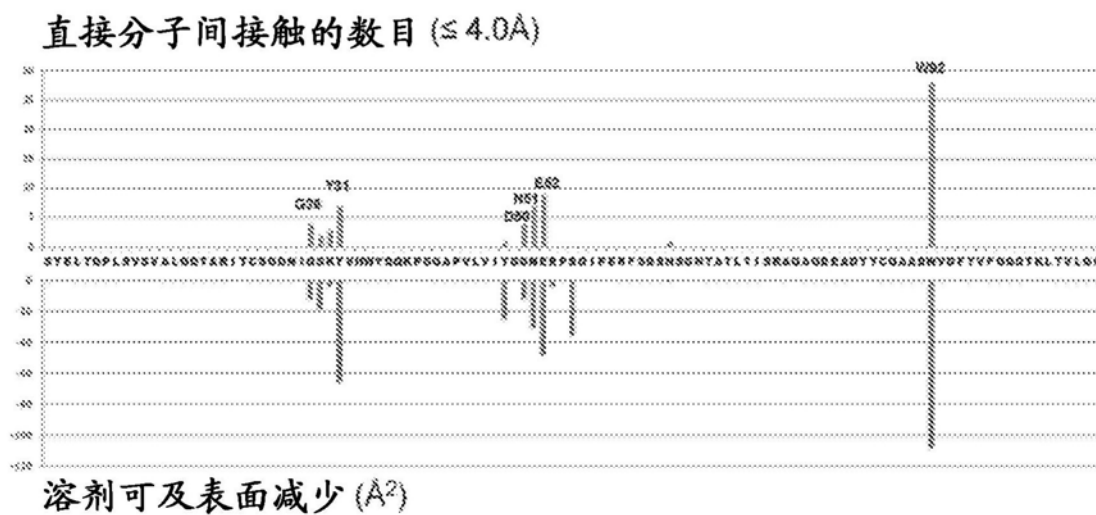


图10B

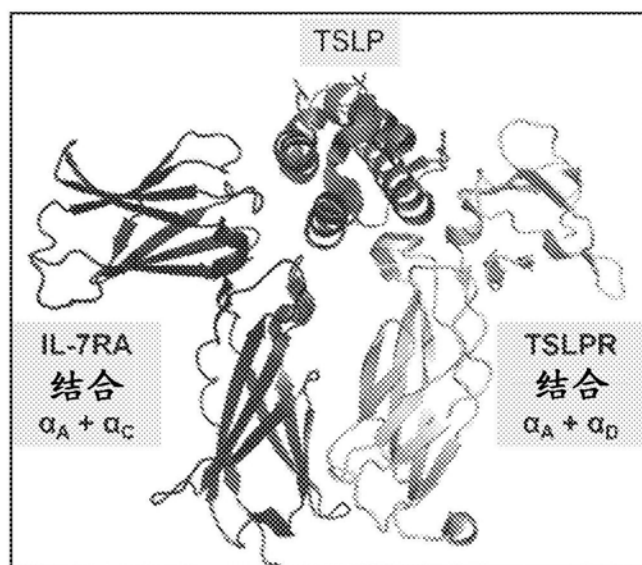


图11A

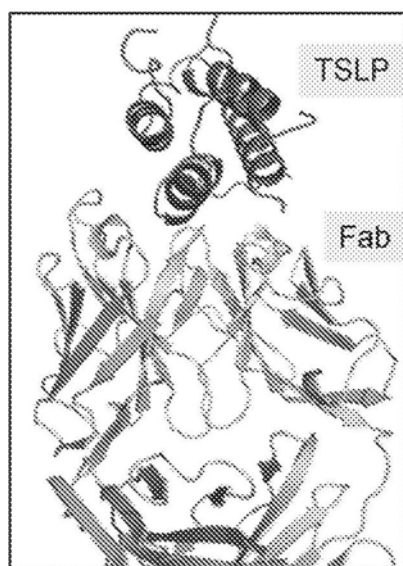


图11B

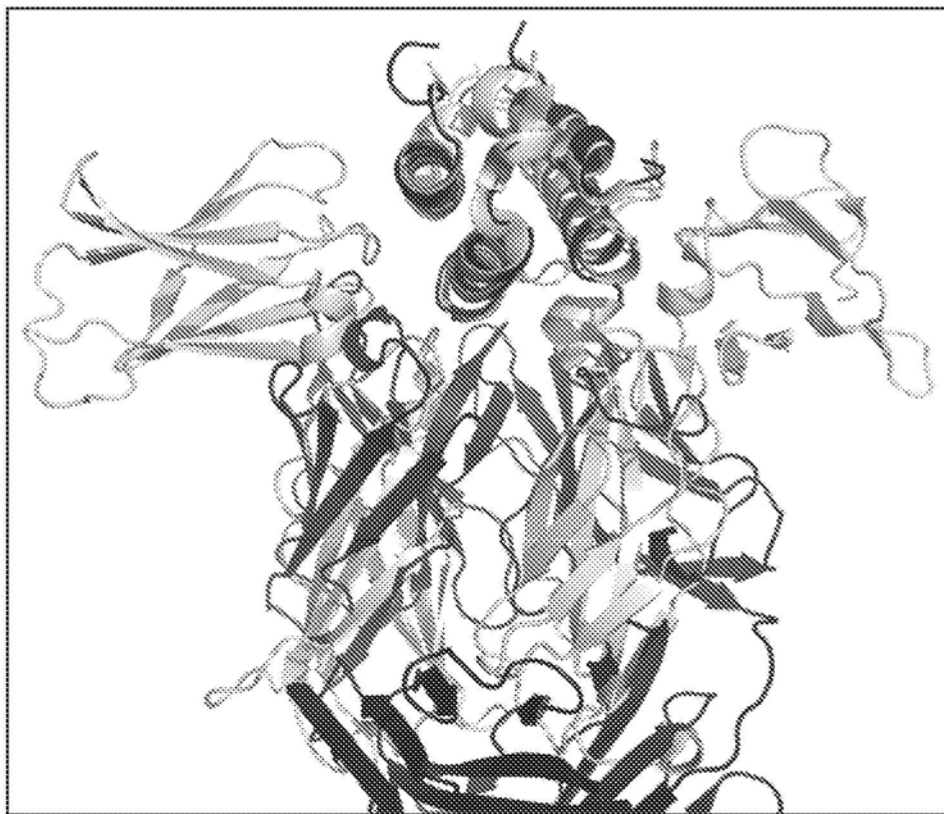


图11C

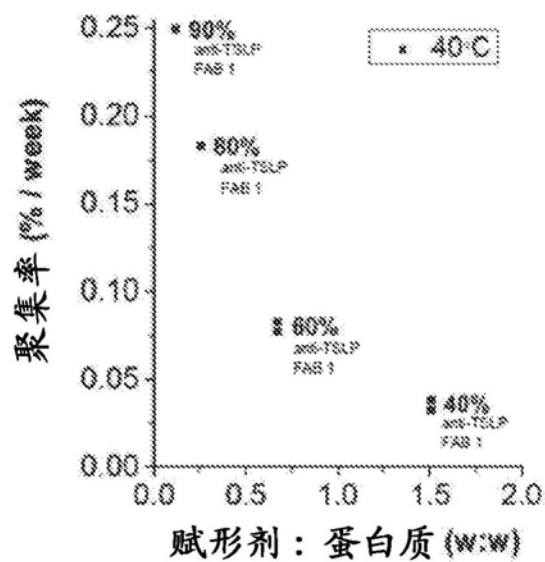


图12