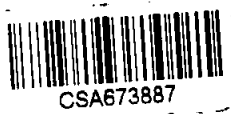


Nota

QF



Organización y
Digitalización CSA Ltda

PCT

INVENTARI

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

09-144825

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: MÉTODOS Y COMPISICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES ALÉRGICAS

SOLICITANTE: IRM LLC

DIRECCIÓN: 131 Front Street, P.O. Box HM 2899, Hamilton HM LX, Bermuda

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 17 de Diciembre de 2009

P2009/000209

Todo, No pidiendo, Exento de y representado:
FN-20-01-2010

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-144825- -00000-0000

Fecha: 2009-12-17 17:00:18 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 214

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2009/000209

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: IRM LLC

Dirección: 131 Front Street Hamilton HM 12,
Bermuda

Nacionalidad o Domicilio: Bermuda

Lugar de Constitución: Bermuda

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: 1) Lique DONG 2) Marc NASOFF

Dirección: 1) 5057 Sterling Grove Lane, San Diego, California 92130
2) 11734 Mira Lago Way, San Diego, California 92131

Nacionalidad o Domicilio: 1) China 2) Estadounidense

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2008/057731

Fecha Junio 18, 2008

Publicación Internacional No. WO 2008/155365

Fecha Diciembre 24, 2008

6

Título (54) MÉTODOS Y COMPISICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES ALÉRGICAS (7. 222)

Clasificación Internacional (51) C70K 16/28

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Junio 20, 2007

(31) Número de
Solicitud

60/945.205

9

Comprobante de pago No. 09- 93755

Fecha Diciembre 14 de 2009



ANEXOS



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 06-122.179



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Declaración bajo la Regla 4.17(ii) del PCT.



Declaraciones.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



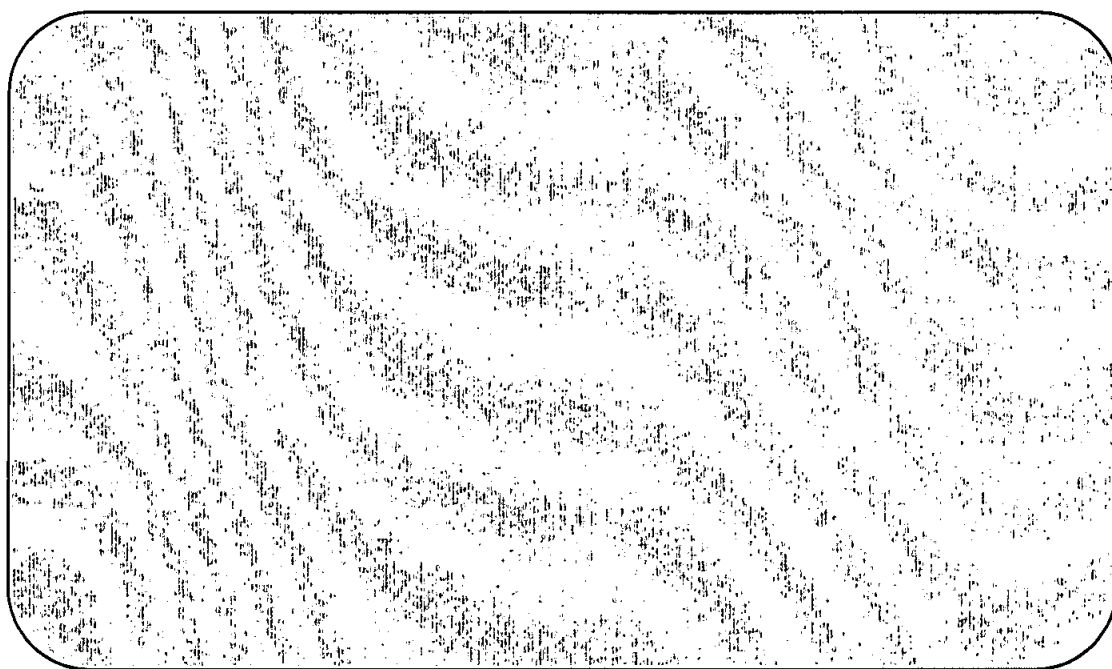
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,
NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

43

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

LIBRO OFICIAL DE CAJA : 09 - 93.755
CHA : DICIEMBRE 14 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-144825-00000-0000

Fecha: 2009-12-17 17:00:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 214

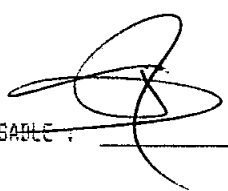
***** CONSIGNACION *****

POSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
IRTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	131166394	14/12/2009	4,669,000.00

***** CONCEPTO *****

IT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
	TOTAL :	\$ 540,000.00

QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : 

LIBRO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

El documento de Poder adjunto de IRM LLC. a Delaware Limited Liability Company lleva la siguiente certificación notarial:

CERTIFICACIÓN

Yo, el suscrito Notario Público de Basilea, Suiza, certifico la autenticidad de las firmas anteriores correspondientes al Dr. Dirk Hillebrand, ciudadano Alemán, residente en Bad Säckingen, Alemania y al Dr. Peter Roth, ciudadano Aleman, residente en Friburgo, Alemania, ambos actuando en nombre de IRM LLC, en Hamilton, Bermudà, ambos apoderados, ambos con firma mancomunada.

La autenticidad de las firmas se estableció por comparación.

Basilea, este día 20 (veinte) de Noviembre de 2006 (dos mil seis).

(Firmado)

Sello: "Dr. Mattias Staehelin - Notario de Basilea"

Protocolo de Legalización No. 1571/2006

Apostilla:


Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

5

APOSTILLA: (Convention de La Haye du 5 octobre 1961)	
1. País:	Suiza
<u>El presente documento público</u>	
2. Ha sido firmado por:	Dr. M. Staehelin
3. Actuando en calidad de:	Notario
4. Lleva el sello/estampilla de:	(Ilegible).
<u>Certificado</u>	
5. En:	Basilea.
6. El:	20 de Noviembre de 2006.
7. Por:	Cancillería municipal del Cantón de la ciudad de Basilea.
8. Bajo el No.:	10413/17.594
9. Sello / estampilla:	Cancillería municipal · Ciudad de Basilea.
10. Firma:	Heidi Fischer

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto:

Título: "IRM LLC – Cert."

Fecha: 29 de Noviembre de 2006.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411. Bogotá, Colombia.

Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925.

E-mail: treseser1@yahoo.com. 8845


Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

33842-CO-PCT

6
Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Zayde Chahin
Jacqueline Chaparro
José Luis Londoño
Felipe Mendoza
Simón Salinas

Of Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

domiciled in

IRM LLC, a Delaware Limited Liability Company

domiciliado en

'Hurst Holme', 12 Trott Road, Hamilton, Bermuda, HM 11

by means of these presents hereby grants to Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

IRM LLC, a Delaware Limited Liability Company

Signature/Firma:


Dirk Hillebrand
Group Head Patents, MCD


Peter Roth
Snr. Patent Attorney

Date/Fecha: 08 November 2006

City/Country/Ciudad,País: Basel, CH

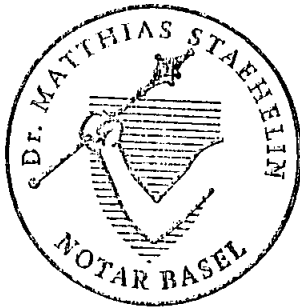
World Trade Center - Torre A, Calle 100 No. 8A - 37, Piso 10, Bogotá D.C., Colombia
Tel + 57 1 601-7700. Fax + 57 1 601-7700. office@olarte-raisbeck.com

Attestation

I, the undersigned notary public in Basel, Switzerland, certify herewith that the above signatures are the genuine signatures of **Dr. Dirk Hillebrand**, German citizen, residing in Bad Säckingen, Germany, and **Dr. Peter Roth**, German citizen, residing in Freiburg, Germany, both acting for **IRM LLC**, in Hamilton, Bermuda, both as proxy holders, both with joint signature.

The authenticity of the signatures was established by means of comparison.

BASEL, this 20th (twentieth) day of November 2006 (two thousand and six).



H. Staehelin, Notar

Leg. Prot. Nr. 1571 / 2006

APOSTILLE (Hague Convention of October 5th, 1961)	
1. Country: Switzerland (chance / Suisse)	
This official document is	
2. signed by <i>Dr. Hillebrand & Dr. Roth</i>	
3. in his/her function <i>off. 120</i>	
4. and certified <i>Staehelin</i>	
Certified 20. NOV. 2006	
5. in Basel (Basle)	6. on
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt	
8. <i>10 428 / 17 594</i>	
9. Seal/Stamp	10. Signature: <i>Heidi Fischer</i>
Heidi Fischer	



Sheet No.

Box No. VIII (ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

in relation to the international application PCT/EP2008/057731,

IRM LLC, a Delaware Limited Liability Company, is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

an assignment from:

DONG, Liquan, 5075 Sterling Grove Lane, San Diego, CA 92130, US, dated 10.06.2008

NASOFF, Marc, 11734 Mira Lago Way, San Diego, CA 92131, US, dated 10.06.2008

to IRM LLC, a Delaware Limited Liability Company.

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (ii)".

4

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 December 2008 (24.12.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/155365 A1

- (51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/EP2008/057731
- (22) International Filing Date: 18 June 2008 (18.06.2008)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/945,205 20 June 2007 (20.06.2007) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **IRM LLC**
[US/US]; Hurst Holme, 12 Trott Road, Hamilton, HM 11 (BM).
- (71) Applicant (for TT only): **NOVARTIS AG** [CH/CH];
Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel (CH).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **DONG, Liquan**
[CN/US]; 5075 Sterling Grove Lane, San Diego, California 92130 (US). **NASOFF, Marc** [US/US]; 11734 Mira Lago Way, San Diego, California 92131 (US).
- (74) Agent: **NASH, Guy**; Novartis Pharma AG, Patent Department, CH-4002 Basel (CH).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATING ALLERGIC DISEASES

(57) Abstract: Disclosed in the present invention are antibodies that specifically recognize and antagonize human TSLP receptor, and methods of employing these antibodies to treat or ameliorate diseases or disorder mediated by TSLP signaling.



WO 2008/155365 A1

a

Methods and Compositions for Treating Allergic DiseasesBACKGROUND OF THE INVENTION

Cytokines and immune cells mediate specific physiological mechanisms or pathways, e.g., pathways leading to the various inflammatory disorders. Human thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is an IL-7-like cytokine that is produced from human epithelial cells. It promotes B-cell differentiation and also can co-stimulate both thymocytes and mature T-cells. TSLP binds to a specific heterodimeric receptor on human CD11c⁺ dendritic cells (DC's). The receptor heterodimer consists of a common gamma-like receptor chain (TSLP receptor; TSLPR) and the IL-7R- α chain. See, e.g., Tonozuka et al., *Cytogenet. Cell Genet.* 93:23-25, 2001; Pandey et al., *Nat. Immunol.* 1:59-64, 2000; L. S. Park et al., *J. Exp. Med.* 192:659-670, 2000; and Reche et al., *J. Immunol.* 167:336-343, 2001. Ligand binding to the receptor induces DC's to secrete T_H2-attracting chemokines, TARC (thymus and activation-regulated chemokine) and MDC (macrophage-derived chemokine). In addition, TSLP also induces potent DC activation, naïve CD4⁺ T cell expansion, and subsequent polarization to a T_H2 phenotype, producing pro-allergic cytokines interleukin 4 (IL-4), IL-5, IL-13 and tumor necrosis factor- α .

It was also found that TSLP signaling results in activation of the Stat5 transcription factor. Furthermore, both acute and chronic atopic dermatitis patients have been reported to over-express TSLP in skin lesions, suggesting that TSLP expression is associated with allergic inflammation in vivo. Aside from skin keratinocytes, high level of TSLP expression have also been found in bronchial epithelial cells, smooth muscles and lung fibroblasts, supporting a potential role for TSLP in respiratory allergic indications as well. Moreover, IgE activated mast cells express very high level of TSLP, a mechanism which could participate in the maintenance of the T_H2 phenotype.

About 20% of the population in the Western countries suffers from inflammatory disorders, e.g., the allergic diseases, which include asthma, rhinitis, atopic dermatitis, and food allergy. From 50% to 80% of the patients with atopic dermatitis have or develop asthma or allergic rhinitis. To date, there is no cure for allergy induced asthma, atopic dermatitis, and allergic rhinitis. Current treatments, such as beta-2 adrenoceptor antagonists for asthma, Elidel for atopic dermatitis, and H1-antihistamine for allergic rhinitis, are used to target the symptoms. Thus, there is an increased need in the art for better therapies to treat these

10

inflammatory disorders, in particular, allergic inflammation. The present invention addresses this and other problems.

SUMMARY OF THE INVENTION

An embodiment of the invention herein provides an isolated human or humanized antibody or functional fragment thereof with an antigen binding region that is specific for target protein human thymic stromal lymphopoietin receptor (hTSLPR) and the antibody or functional fragment thereof binds to hTSLPR. In a related embodiment, the binding to hTSLPR is determined at least by cell surface hTSLP receptor binding preventing inflammatory mediator release.

In still another embodiment, the invention provides an isolated antigen binding region of an antibody or functional fragment thereof. In certain embodiments, the isolated antigen binding region includes an CDRH1 region having an amino acid sequence set forth in SEQ.I.D.NO:1, and conservative variants thereof. As described herein, the conservative variants include amino acid residues in any of the amino acid sequences identified. In a related embodiment, the isolated antigen binding region is an CDRH2 region having an amino acid sequence set forth in SEQ.I.D.NO:2, and conservative variants thereof. In another related embodiment, the isolated antigen binding region is an CDRH3 region having an amino acid sequence set forth in SEQ.I.D.NO:3, and conservative variants thereof.

In another embodiment, the isolated antigen binding region is an CDRL1 region having an amino acid sequence set forth in SEQ.I.D.NO:4, and conservative variants thereof. In still another related embodiment, the isolated antigen binding region is an CDRL2 region having an amino acid sequence set forth in SEQ.I.D.NO:5, and conservative variants thereof. In yet another related embodiment, the isolated antigen binding region is an CDRL3 region having an amino acid sequence set forth in SEQ.I.D.NO:6, and conservative variants thereof.

In another embodiment, the isolated antigen binding region is a heavy chain having the variable region amino acid sequence set forth in SEQ.I.D.NO:7, and a sequence having at least 60, 70, 80, 90 or 95 percent sequence identity in the CDR regions with the CDR region of SEQ ID NO: 7. In a related embodiment, the isolated antigen binding region is a light chain having the variable region amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 8, and a

sequence having at least 60, 70, 80, 90 or 95 percent sequence identity in the CDR regions with the CDR region of SEQ ID NO: 8.

In another aspect, the present invention provides monoclonal antagonist antibodies against hTSLPR. Some of the anti-TSLPR antibodies of the invention have the same binding specificity as that of a reference antibody that contains a heavy chain variable region sequence of SEQ ID NO: 7 and a light chain variable region sequence of SEQ ID NO: 8. Some of these antibodies are fully human antibodies which exhibit the same binding specificity as that of the reference antibody. Some of the antibodies have a heavy chain complementarity determining region (CDR) sequence of SEQ ID NO: 1, 2 or 3 and/or a light chain CDR sequence of SEQ ID NO: 4, 5 or 6.

Some of the anti-hTSLPR antibodies have heavy chain CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO: 3, respectively; and light chain CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, and SEQ ID NO: 6, respectively. Some other antibodies of the invention contain a heavy chain variable region amino acid sequence that is at least 85% identical to SEQ ID NO: 7 and a light chain variable region amino acid sequence that is at least 85% identical to SEQ ID NO: 8. Some other anti-hTSLPR antibodies of the invention have a heavy chain variable region amino acid sequence that is identical to SEQ ID NO: 7 and a light chain variable region amino acid sequence that is identical to SEQ ID NO: 8 with a human IgG constant region (e.g. an IgG1 or IgG4).

Some anti-hTSLPR antibodies of the invention are mouse antibodies. Some others are chimeric antibodies. Some of the chimeric antibodies have a human heavy chain constant region and a human light chain constant region. Some other anti-hTSLPR antibodies of the invention are humanized antibodies. Some other anti-hTSLPR antibodies of the invention are fully human antibodies that exhibit the same binding specificity as an antibody that contains a heavy chain variable region sequence of SEQ ID NO: 7 and a light chain variable region sequence of SEQ ID NO: 8. Also provided in the invention are single chain antibodies, e.g., a Fab fragment. Some of the anti-hTSLPR antibodies are of IgG1 isotype. Some other antibodies are of IgG4 isotype.

In another aspect, the invention provides isolated or recombinant polynucleotides (e.g., DNA) that encode a polypeptide containing the heavy chain variable region or the light chain variable region of an anti-hTSLPR antibody of the invention. For example, the



polynucleotides can encode an antibody heavy chain that contains heavy chain CDR1, CDR2, and CDR3 sequences as set forth above, respectively. The polynucleotides can also encode an antibody light chain that contains CDR1, CDR2, and CDR3 sequences as set forth above, respectively. Some polynucleotides of the invention encode a mature heavy chain variable region sequence that is at least 90% identical to the mature region of SEQ ID NO: 7. Some other polynucleotides encode a mature light chain variable region sequence that is at least 90% identical to the mature region of SEQ ID NO: 8. Some of these polynucleotides encode a mature heavy chain variable region sequence that is identical to the mature region of SEQ ID NO: 7 or a mature light chain variable region sequence that is identical to the mature region of SEQ ID NO: 8. Exemplary sequences of polynucleotides that encode heavy and light chains of the invention include SEQ.I.D.NO:13 and 14 respectively.

In another aspect, the invention provides isolated host cells that harbor (1) a recombinant DNA segment encoding a heavy chain of an anti-hTSLPR antibody of the invention, and (2) a second recombinant DNA segment encoding a light chain of the antibody. In some of the host cells, the recombinant DNA segments are respectively operably linked to a first and a second promoter, and are capable of being expressed in the host cells. Some of these host cells express a monoclonal antibody that have heavy chain CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, (e.g. SEQ.I.D.NO:1, 2 and 3), respectively; and light chain CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, (e.g. SEQ.I.D.NO:4,5 and 6), respectively. Some other host cells express an anti-hTSLPR antibody that contains a mature heavy chain variable region sequence that is at least 90% identical to the mature region of SEQ ID NO: 7; and a mature light chain variable region sequence that is at least 90% identical to the mature region of SEQ ID NO: 8. Some of these host cells express an anti-hTSLPR antibody that contains a mature heavy chain variable region sequence that is identical to the mature region of SEQ ID NO: 7 and a mature light chain variable region sequence that is identical to the mature region of SEQ ID NO: 8. Some of the host cells are non-human mammalian cells (e.g. CHO, NS0, SP2/0).

In another aspect, the invention provides methods of treating an inflammatory disease or disorder in a subject, e.g., a human patient. These methods entail administering to the subject a pharmaceutical composition that contains an effective amount of an anti-hTSLPR antibody. Typically, the anti-hTSLPR antibody has the same binding specificity as that of an anti-hTSLPR antibody that contains a heavy chain variable region sequence of SEQ ID NO: 7

13

and a light chain variable region sequence of SEQ ID NO: 8. In some of these therapeutic methods, a fully human antibody is employed. In some methods, the anti-TSLPR antibody harbors heavy chain CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, SEQ.I.D.NO:1,2 and 3 respectively; and light chain CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, SEQ.I.D.NO:4,5 and 6, respectively. In some methods, the employed anti-hTSLPR antibody contains a mature heavy chain variable region sequence that is identical to the mature region of SEQ ID NO: 7, and a mature light chain variable region sequence that is identical to the mature region of SEQ ID NO: 8. Some of the methods are directed to treating subjects that suffer from an allergic inflammatory disease. Examples of allergic inflammatory diseases that are amenable to treatment include atopic dermatitis, asthma, or allergic rhinitis.

In still another embodiment, the invention provides an isolated antigen binding region of an antibody or functional fragment thereof. In certain embodiments, the isolated antigen binding region includes an CDRH1 region having an amino acid sequence set forth in SEQ.I.D.NO:1, or conservative variants thereof. As described herein, the conservative variants include amino acid residues in any of the amino acid sequences identified. In a related embodiment, the isolated antigen binding region is an CDRH2 region having an amino acid sequence set forth in SEQ.I.D.NO:2, or conservative variants thereof. In another related embodiment, the isolated antigen binding region is an CDRH3 region having an amino acid sequence set forth in SEQ.I.D.NO:3, or conservative variants thereof.

In another embodiment, the isolated antigen binding region is an CDRL1 region having an amino acid sequence set forth in SEQ.I.D.NO:4, or conservative variants thereof. In still another related embodiment, the isolated antigen binding region is an CDRL2 region having an amino acid sequence set forth in SEQ.I.D.NO:5, or conservative variants thereof. In yet another related embodiment, the isolated antigen binding region is an CDRL3 region having an amino acid sequence set forth in SEQ.I.D.NO:6, or conservative variants thereof.

In another embodiment, the isolated antigen binding region is a heavy chain having the variable region amino acid sequence set forth in SEQ.I.D.NO:7, and a sequence having at least 60, 70, 80, 90 or 95 percent sequence identity in the CDR regions with the CDR region of SEQ ID NO: 7. In a related embodiment, the isolated antigen binding region is a light chain having the variable region amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 8, and a sequence having at least 60, 70, 80, 90 or 95 percent sequence identity in the CDR regions with the CDR region of SEQ ID NO: 8.



In another aspect, the present invention provides monoclonal antagonist antibodies against hTSLPR. Some of the anti-TSLPR antibodies of the invention have the same binding specificity as that of a reference antibody that contains a heavy chain variable region sequence of SEQ ID NO: 7 and a light chain variable region sequence of SEQ ID NO: 8. Some of these antibodies are fully human antibodies which exhibit the same binding specificity as that of the reference antibody

In another aspect, the invention provides isolated or recombinant polynucleotides (e.g., DNA) that encode a polypeptide containing the heavy chain variable region or the light chain variable region of an anti-hTSLPR antibody of the invention. For example, the polynucleotides can encode an antibody heavy chain that contains heavy chain CDR1, CDR2, and CDR3 sequences as set forth above, respectively. The polynucleotides can also encode an antibody light chain that contains CDR1, CDR2, and CDR3 sequences as set forth above, respectively. Some polynucleotides of the invention encode a mature heavy chain variable region sequence that is at least 90% identical to the mature region of SEQ ID NO: 7. Some other polynucleotides encode a mature light chain variable region sequence that is at least 90% identical to the mature region of SEQ ID NO: 8. Some of these polynucleotides encode a mature heavy chain variable region sequence that is identical to the mature region of SEQ ID NO: 7 or a mature light chain variable region sequence that is identical to the mature region of SEQ ID NO: 8.

In another aspect, the invention provides isolated host cells that harbor (1) a recombinant DNA segment encoding a heavy chain of an anti-hTSLPR antibody of the invention, and (2) a second recombinant DNA segment encoding a light chain of the antibody. In some of the host cells, the recombinant DNA segments are respectively operably linked to a first and a second promoter, and are capable of being expressed in the host cells. Some of these host cells express a monoclonal antibody that have heavy chain CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, (e.g. SEQ.I.D.NO:1, 2 and 3), respectively; and light chain CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, (e.g. SEQ.I.D.NO:4, 5 and 6), respectively. Some other host cells express an anti-hTSLPR antibody that contains a mature heavy chain variable region sequence that is at least 90% identical to the mature region of SEQ ID NO: 7; and a mature light chain variable region sequence that is at least 90% identical to the mature region of SEQ ID NO: 8. Some of these host cells express an anti-hTSLPR antibody that contains a mature heavy chain variable region sequence that is identical to the mature region

15

of SEQ ID NO: 7 and a mature light chain variable region sequence that is identical to the mature region of SEQ ID NO:8. Some of the host cells are non-human mammalian cells (e.g. CHO, NS0, SP2/0).

In another aspect, the invention provides methods of treating an inflammatory disease or disorder in a subject, e.g., a human patient. These methods entail administering to the subject a pharmaceutical composition that contains an effective amount of an anti-hTSLPR antibody. Typically, the anti-hTSLPR antibody has the same binding specificity as that of an anti-hTSLPR antibody that contains a heavy chain variable region sequence of SEQ ID NO: 7 and a light chain variable region sequence of SEQ ID NO:8 and/or an isolated antibody comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:9 and a light chain of SEQ.I.D.NO:10. In some of these therapeutic methods, a fully human antibody is employed. Some of the methods are directed to treating subjects that suffer from an allergic inflammatory disease. Examples of allergic inflammatory diseases that are amenable to treatment include atopic dermatitis, asthma, or allergic rhinitis.

In other aspects of the invention there is provided an isolated anti-hTSLPR antibody comprising (or consisting of) a heavy chain of SEQ.I.D.NO:9 and a light chain of SEQ.I.D.NO:10. The invention also provides a pharmaceutical composition comprising the antibody comprising (or consisting of) a heavy chain of SEQ.I.D.NO:9 and a light chain of SEQ.I.D.NO:10 together with a pharmaceutically acceptable carrier as known and called for by accepted pharmaceutical practice.

In still another embodiment, the invention provides an immunoconjugate made out of a first component which is an antibody or fragment thereof and a second component having a second amino acid sequence. For example, the immunoconjugate is a cytotoxin, or the immunoconjugate is a binding protein or antibody having a binding specificity for a target that is different from hTSLPR.

In another embodiment, the invention provides a kit having an antibody or antibody fragment thereof of the invention as previously described (e.g. the antibody of SEQ.I.D.NO:9 and 10). In some embodiments, the kit further contains a pharmaceutically acceptable carrier or excipient therefore. In other related embodiments, the antibody in the kit is present in a unit dose. In yet another related embodiment, the kit includes instructions for use in administering to a subject.

1/b

A further understanding of the nature and advantages of the present invention may be realized by reference to the remaining portions of the specification and claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. Binding of NV163-1 Fab' and NV164-1-Fab' to Human TSLPR in ELISA. An ELISA plate was coated with hTSLPR. The plate was sequentially incubated with anti-hTSLPR Fab', HRP-conjugated goat anti-human IgG, F(ab')₂ specific antibody, and TMB substrate. NV163-1-Fab' and NV164-1-Fab' were used at concentrations range from 2.1×10^{-14} to 3.3×10^{-8} M as indicated. NV-164-1 comprises the variable region of SEQ.I.D.NO:7 and 8. NV164-1-IgG1 consists of a heavy chain of SEQ.I.D.NO:9 and a light chain of SEQ.I.D.NO:10, and NV164-1 is an embodiment of the invention. NV161-1 comprises the variable region of SEQ.I.D.NO:21 and SEQ.I.D.NO:22.

Figure 2. Binding Specificity of NV163-1-Fab' and NV164-1-Fab' to Human TSLPR, Mouse TSLPR, and Human IL7R α in ELISA. An ELISA plate was coated with hTSLPR, mTSLPR or hIL7R α . The plate was incubated with anti-hTSLPR Fab' followed by HRP-conjugated goat anti-human IgG, F(ab')₂ specific antibody, and TMB substrate. Nv163-1-Fab' and nv164-1-Fab' were used at concentrations range from 2.1×10^{-14} to 3.3×10^{-8} M as indicated.

Figure 3. Antagonist Activity of NV163-1-Fab' and NV164-1-Fab' in Luciferase Reporter Gene Assay. Ba/F3 cells stably overexpressing hTSLPR/hIL7R α /Stat5-Luc were pre-incubated with Fab', and then stimulated with 1 ng/ml human TSLP. After 6 hr incubation, luciferase activity was measured using Bright-Glo. NV163-1-Fab' and NV164-1-Fab' were used at concentrations range from 1.7×10^{-13} to 3.0×10^{-8} M as indicated. This figure is representative of a number of individual experiments. IC₅₀ is 2.7 ± 1.9 nM for NV163-1-Fab' and 4.0 ± 2.1 nM for NV164-1-Fab' (n = 4).

Figure 4: Binding Specificity of NVP164-1-IgG1 to Human TSLPR, Mouse TSLPR, and Human IL7R α in ELISA. An ELISA plate was coated with hTSLPR, mTSLPR or hIL7R α . The plate was incubated with anti-hTSLPR, NVP-164-IgG1, followed by HRP-conjugated goat anti-human IgG, F(ab')₂ specific antibody, and TMB substrate. NVP164-1-IgG1 was used at concentrations range from 1.2×10^{-17} to 1.2×10^{-7} M as indicated.



Figure 5. Cross-reactivity of NVP164-1-IgG1 to human and cynomolgus TSLPR in ELISA. An ELISA plate was coated with hTSLPR, or cTSLPR. The plate was incubated with anti-hTSLPR, NVP164-1-IgG1, followed by HRP-conjugated goat anti-human IgG, F(ab')₂ specific antibody, and TMB substrate. NVP164-1-IgG1 was used at concentrations range from 2.1×10^{-14} to 1.0×10^{-7} M as indicated.

Figure 7. Figure 6. Binding NV164-1-IgG1 and NV115-3B-IgG1 to Human TSLPR in ELISA. An ELISA plate was coated with hTSLPR. The plate was incubated with NV164-1-IgG1 or NV115-3B-IgG1, followed by HRP-conjugated goat anti-human IgG, F(ab')₂ specific antibody, and TMB substrate. NV164-1-IgG1 and NV115-3B-IgG1 were used at concentrations range from 2.1×10^{-14} to 1.0×10^{-7} M as indicated.

Figure 7. Antagonist Activity of NV164-1-IgG1 and NV115-3B-IgG1 in Luciferase Reporter Gene Assay. Ba/F3 cells stably overexpressing hTSLPR/hIL7R α /Stat5-Luc were pre-incubated with antibody, and then stimulated with 1 ng/ml recombinant human TSLP. After 6 hr incubation, luciferase activity was measured using Bright-Glo (Promega). Antibodies were used at concentrations range from 1.7×10^{-13} to 3.0×10^{-8} M as indicated. The graph is from one of representative individual experiments. IC₅₀ is 221 ± 101 pM for NV164-1-IgG1 (n = 8) and 126 ± 72 pM for NV115-3B-IgG1 (n = 6).

Figure 8. Antagonist Activity of NV164-1-IgG1 and NV115-3B-IgG1 against natural source TSLP in Luciferase Reporter Gene Assay. Ba/F3 cells stably overexpressing hTSLPR/hIL7R α /Stat5-Luc were pre-incubated with antibody, and then stimulated with 1 ng/ml natural human TSLP. After 6 hr incubation, luciferase activity was measured using Bright-Glo. Antibodies were used at concentrations range from 6.7×10^{-14} to 6.7×10^{-9} M as indicated. IC₅₀ is 40 ± 10 pM for NV164-1-IgG1 and 50 ± 25 pM for NV115-3B-IgG1.

14

Figure 9. Inhibition of TARC secretion from primary human monocytes. Human blood was collected from health adult volunteers. PBMCs were isolated by Ficoll density centrifugation. Monocytes were isolated by using the Monocyte Isolation kit II (Miltenyi Biotec). Freshly isolated monocytes were incubated with antibodies for 20 min, followed by 24 hr treatment with 1 ng/ml human TSLP. Amount of secreted TARC was determined by sandwich ELISA. Antibodies were used at concentrations range from 6.7×10^{-13} to 6.7×10^{-8} M as indicated. IC_{50} is 11 ± 10 pM for NV164-1-IgG1 and 10 ± 4 pM for NV115-3B-IgG1.

Figures 10A to C: Single dose cynomolgus monkey pharmacokinetic data. Amount of antibody remaining in blood was determined by competition ELISA. Increasing free antibody titre observed occurring at later time points suggests that the labeled antibody was bound by anti-idiotypic antibodies and therefore was not available for binding to the ELISA plate. This in turn suggests immunogenicity.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention is predicated in part on the development by the present inventors of antagonist antibodies against human TSLPR. The anti-hTSLPR antibodies generated in mouse or chimeric anti-hTSLPR antibodies created in vitro were found to be able to inhibit activities mediated by TSLP signaling, e.g., TSLP-mediated cell proliferation. Thus, these antibodies are useful as therapeutic or prophylactic agents against a number of diseases or disorders mediated by or associated with TSLP signaling activities, e.g., allergic inflammatory diseases such as atopic dermatitis and asthma. The following sections provide guidance for making and using the compositions of the invention, and for carrying out the methods of the invention.

I. Definitions

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by those of ordinary skill in the art to which this invention pertains. The following references provide one of skill with a general definition of many of



the terms used in this invention: Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Smith et al. (eds.), Oxford University Press (revised ed., 2000); Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Singleton et al. (Eds.), John Wiley & Sons (3PrdP ed., 2002); and A Dictionary of Biology (Oxford Paperback Reference), Martin and Hine (Eds.), Oxford University Press (4PthP ed., 2000). In addition, the following definitions are provided to assist the reader in the practice of the invention.

In order that the present invention may be more readily understood, certain terms are first defined. Additional definitions are set forth throughout the detailed description.

The term "immune response" refers to the action of, for example, lymphocytes, antigen presenting cells, phagocytic cells, granulocytes, and soluble macromolecules produced by the above cells or the liver (including antibodies, cytokines, and complement) that results in selective damage to, destruction of, or elimination from the human body of invading pathogens, cells or tissues infected with pathogens, cancerous cells, or, in cases of autoimmunity or pathological inflammation, normal human cells or tissues.

A "signal transduction pathway" refers to the biochemical relationship between a variety of signal transduction molecules that play a role in the transmission of a signal from one portion of a cell to another portion of a cell.

The term "antibody" as referred to herein includes whole antibodies and any antigen binding fragment (i. e., "antigen-binding portion") or single chains thereof. A naturally occurring "antibody" is a glycoprotein comprising at least two heavy (H) chains and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds. Each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (abbreviated herein as V_H) and a heavy chain constant region. The heavy chain constant region is comprised of three domains, CH1, CH2 and CH3. Each light chain is comprised of a light chain variable region (abbreviated herein as V_L) and a light chain constant region. The light chain constant region is comprised of one domain, C_L . The V_H and V_L regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity determining regions (CDR), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each V_H and V_L is composed of three CDRs and four FRs arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. The variable regions of the heavy and light chains contain a binding domain that interacts with an antigen. The constant regions of the



antibodies may mediate the binding of the immunoglobulin to host tissues or factors, including various cells of the immune system (e.g., effector cells) and the first component (C1q) of the classical complement system.

The term "antigen-binding portion" of an antibody (or simply "antigen portion"), as used herein, refers to full length or one or more fragments of an antibody that retain the ability to specifically bind to an antigen (e.g., TSLPR). It has been shown that the antigen-binding function of an antibody can be performed by fragments of a full-length antibody. Examples of binding fragments encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody include a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the V_L , V_H , C_L and $CH1$ domains; a $F(ab)_2$ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; a F_d fragment consisting of the V_H and $CH1$ domains; a F_v fragment consisting of the V_L and V_H domains of a single arm of an antibody; a dAb fragment (Ward et al., 1989 Nature 341:544-546), which consists of a V_H domain; and an isolated complementarity determining region (CDR).

Furthermore, although the two domains of the F_v fragment, V_L and V_H , are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the V_L and V_H regions pair to form monovalent molecules (known as single chain F_v (scFv); see e.g., Bird et al., 1988 Science 242:423-426; and Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883). Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody. These antibody fragments are obtained using conventional techniques known to those of skill in the art, and the fragments are screened for utility in the same manner as are intact antibodies.

An "isolated antibody", as used herein, refers to an antibody that is substantially free of other antibodies having different antigenic specificities (e.g., an isolated antibody that specifically binds TSLPR is substantially free of antibodies that specifically bind antigens other than TSLPR). An isolated antibody that specifically binds TSLPR may, however, have cross-reactivity to other antigens, such as TSLPR molecules from other species. Moreover, an isolated antibody may be substantially free of other cellular material and/or chemicals.

The terms "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody composition" as used herein refer to a preparation of antibody molecules of single molecular composition. A

monoclonal antibody composition displays a single binding specificity and affinity for a particular epitope.

The term "human antibody", as used herein, is intended to include antibodies having variable regions in which both the framework and CDR regions are derived from sequences of human origin. Furthermore, if the antibody contains a constant region, the constant region also is derived from such human sequences, e.g., human germline sequences, or mutated versions of human germline sequences. The human antibodies of the invention may include amino acid residues not encoded by human sequences (e.g., mutations introduced by random or site-specific mutagenesis in vitro or by somatic mutation in vivo).

The term "human monoclonal antibody" refers to antibodies displaying a single binding specificity which have variable regions in which both the framework and CDR regions are derived from human sequences. In one embodiment, the human monoclonal antibodies are produced by a hybridoma which includes a B cell obtained from a transgenic nonhuman animal, e.g., a transgenic mouse, having a genome comprising a human heavy chain transgene and a light chain transgene fused to an immortalized cell.

The term "recombinant human antibody", as used herein, includes all human antibodies that are prepared, expressed, created or isolated by recombinant means, such as antibodies isolated from an animal (e.g., a mouse) that is transgenic or transchromosomal for human immunoglobulin genes or a hybridoma prepared therefrom, antibodies isolated from a host cell transformed to express the human antibody, e.g., from a transfectoma, antibodies isolated from a recombinant, combinatorial human antibody library, and antibodies prepared, expressed, created or isolated by any other means that involve splicing of all or a portion of a human immunoglobulin gene, sequences to other DNA sequences. Such recombinant human antibodies have variable regions in which the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences. In certain embodiments, however, such recombinant human antibodies can be subjected to in vitro mutagenesis (or, when an animal transgenic for human Ig sequences is used, in vivo somatic mutagenesis) and thus the amino acid sequences of the V_H and V_L regions of the recombinant antibodies are sequences that, while derived from and related to human germline V_H and V_L sequences, may not naturally exist within the human antibody germline repertoire in vivo.

A "chimeric antibody" is an antibody molecule in which (a) the constant region, or a portion thereof, is altered, replaced or exchanged so that the antigen binding site (variable region) is linked to a constant region of a different or altered class, effector function and/or species, or an entirely different molecule which confers new properties to the chimeric antibody, e.g., an enzyme, toxin, hormone, growth factor, drug, etc.; or (b) the variable region, or a portion thereof, is altered, replaced or exchanged with a variable region having a different or altered antigen specificity. For example, as shown in the Examples below, a mouse anti-hTSLPR antibody can be modified by replacing its constant region with the constant region from a human immunoglobulin. Due to the replacement with a human constant region, the chimric antibody can retain its specificity in recognizing human TSLPR while having reduced antigenicity in human as compared to the original mouse antibody.

A "humanized" antibody is an antibody that retains the reactivity of a non-human antibody while being less immunogenic in humans. This can be achieved, for instance, by retaining the non-human CDR regions and replacing the remaining parts of the antibody with their human counterparts (i.e., the constant region as well as the framework portions of the variable region). See, e.g., Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855, 1984; Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92, 1988; Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536, 1988; Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498, 1991; and Padlan, *Molec. Immun.*, 31:169-217, 1994. Other examples of human engineering technology include, but is not limited to Xoma technology disclosed in US 5,766,886.

The term "Humaneering" as used herein refers to a method for converting non-human antibodies into engineered human antibodies (See e.g., KaloBios' Humaneering™ technology).

As used herein, "isotype" refers to the antibody class (c.g., IgM, IgE, IgG such as IgG1 or IgG4) that is provided by the heavy chain constant region genes.

The phrases "an antibody recognizing an antigen" and "an antibody specific for an antigen" are used interchangeably herein with the term "an antibody which binds specifically to an antigen."

As used herein, an antibody that "specifically binds to human TSLPR" refers to an antibody that binds to human TSLPR with a K_D of 200×10^{-12} M or less, 150×10^{-12} M or less, or 100×10^{-12} M or less.

The term "binding specificity" as used herein refers to the ability of an individual antibody combining site to react with only one antigenic determinant. The combining site of the antibody is located in the Fab portion of the molecule and is constructed from the hypervariable regions of the heavy and light chains. Binding affinity of an antibody is the strength of the reaction between a single antigenic determinant and a single combining site on the antibody. It is the sum of the attractive and repulsive forces operating between the antigenic determinant and the combining site of the antibody. Affinity is the equilibrium constant that describes the antigen-antibody reaction.

Specific binding between two entities means a binding with an equilibrium constant (K_A) of at least $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , or 10^{10} M^{-1} . The phrase "specifically (or selectively) binds" to an antibody (e.g., an anti-hTSLPR antibody) refers to a binding reaction that is determinative of the presence of a cognate antigen (e.g., a human TSLPR polypeptide) in a heterogeneous population of proteins and other biologics. In addition to the equilibrium constant (K_A) noted above, an anti-hTSLPR antibody of the invention typically also has a dissociation constant (K_d) of about $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ or lower, and binds to human TSLPR with an affinity that is at least two-fold greater than its affinity for binding to a non-specific antigen (e.g., BSA). The phrases "an antibody recognizing an antigen" and "an antibody specific for an antigen" are used interchangeably herein with the term "an antibody which binds specifically to an antigen".

The term "epitope" means a protein determinant capable of specific binding to an antibody. Epitopes usually consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or sugar side chains and usually have specific three dimensional structural characteristics, as well as specific charge characteristics. Conformational and nonconformational epitopes are distinguished in that the binding to the former but not the latter is lost in the presence of denaturing solvents.

The term "nucleic acid" is used herein interchangeably with the term "polynucleotide" and refers to deoxyribonucleotides or ribonucleotides and polymers thereof in either single- or double-stranded form. The term encompasses nucleic acids containing

94

known nucleotide analogs or modified backbone residues or linkages, which are synthetic, naturally occurring, and non-naturally occurring, which have similar binding properties as the reference nucleic acid, and which are metabolized in a manner similar to the reference nucleotides. Examples of such analogs include, without limitation, phosphorothioates, phosphoramidates, methyl phosphonates, chiral-methyl phosphonates, 2-O-methyl ribonucleotides, peptide-nucleic acids (PNAs).

Unless otherwise indicated, a particular nucleic acid sequence also implicitly encompasses conservatively modified variants thereof (e.g., degenerate codon substitutions) and complementary sequences, as well as the sequence explicitly indicated. Specifically, as detailed below, degenerate codon substitutions may be achieved by generating sequences in which the third position of one or more selected (or all) codons is substituted with mixed-base and/or deoxyinosine residues (Batzner et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081, 1991; Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985; and Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98, 1994).

The term "amino acid" refers to naturally occurring and synthetic amino acids, as well as amino acid analogs and amino acid mimetics that function in a manner similar to the naturally occurring amino acids. Naturally occurring amino acids are those encoded by the genetic code, as well as those amino acids that are later modified, e.g., hydroxyproline, γ -carboxyglutamate, and O-phosphoserine. Amino acid analogs refer to compounds that have the same basic chemical structure as a naturally occurring amino acid, i.e., an α carbon that is bound to a hydrogen, a carboxyl group, an amino group, and an R group, e.g., homoserine, norleucine, methionine sulfoxide, methionine methyl sulfonium. Such analogs have modified R groups (e.g., norleucine) or modified peptide backbones, but retain the same basic chemical structure as a naturally occurring amino acid. Amino acid mimetics refers to chemical compounds that have a structure that is different from the general chemical structure of an amino acid, but that functions in a manner similar to a naturally occurring amino acid.

The terms "polypeptide" and "protein" are used interchangeably herein to refer to a polymer of amino acid residues. The terms apply to amino acid polymers in which one or more amino acid residue is an artificial chemical mimetic of a corresponding naturally occurring amino acid, as well as to naturally occurring amino acid polymers and non-



naturally occurring amino acid polymer. Unless otherwise indicated, a particular polypeptide sequence also implicitly encompasses conservatively modified variants thereof.

The term "conservatively modified variant" applies to both amino acid and nucleic acid sequences. With respect to particular nucleic acid sequences, conservatively modified variants refers to those nucleic acids which encode identical or essentially identical amino acid sequences, or where the nucleic acid does not encode an amino acid sequence, to essentially identical sequences. Because of the degeneracy of the genetic code, a large number of functionally identical nucleic acids encode any given protein. For instance, the codons GCA, GCC, GCG and GCU all encode the amino acid alanine. Thus, at every position where an alanine is specified by a codon, the codon can be altered to any of the corresponding codons described without altering the encoded polypeptide. Such nucleic acid variations are "silent variations," which are one species of conservatively modified variations. Every nucleic acid sequence herein which encodes a polypeptide also describes every possible silent variation of the nucleic acid. One of skill will recognize that each codon in a nucleic acid (except AUG, which is ordinarily the only codon for methionine, and TGG, which is ordinarily the only codon for tryptophan) can be modified to yield a functionally identical molecule. Accordingly, each silent variation of a nucleic acid that encodes a polypeptide is implicit in each described sequence.

For polypeptide sequences, "conservatively modified variants" include individual substitutions, deletions or additions to a polypeptide sequence which result in the substitution of an amino acid with a chemically similar amino acid. Conservative substitution tables providing functionally similar amino acids are well known in the art. Such conservatively modified variants are in addition to and do not exclude polymorphic variants, interspecies homologs, and alleles of the invention. The following eight groups contain amino acids that are conservative substitutions for one another:

- 1) Alanine (A), Glycine (G);
- 2) Aspartic acid (D), Glutamic acid (E);
- 3) Asparagine (N), Glutamine (Q);
- 4) Arginine (R), Lysine (K);
- 5) Isoleucine (I), Leucine (L), Methionine (M), Valine (V);
- 6) Phenylalanine (F), Tyrosine (Y), Tryptophan (W);

2b

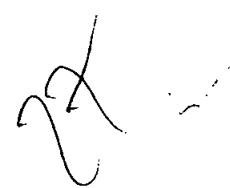
7) Serine (S), Threonine (T); and

8) Cysteine (C), Methionine (M) (*see, e.g., Creighton, Proteins* (1984)).

The terms "identical" or percent "identity," in the context of two or more nucleic acids or polypeptide sequences, refer to two or more sequences or subsequences that are the same. Two sequences are "substantially identical" if two sequences have a specified percentage of amino acid residues or nucleotides that are the same (*i.e.*, 60% identity, optionally 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, or 99% identity over a specified region, or, when not specified, over the entire sequence), when compared and aligned for maximum correspondence over a comparison window, or designated region as measured using one of the following sequence comparison algorithms or by manual alignment and visual inspection. Optionally, the identity exists over a region that is at least about 50 nucleotides (or 10 amino acids) in length, or more preferably over a region that is 100 to 500 or 1000 or more nucleotides (or 20, 50, 200 or more amino acids) in length.

For sequence comparison, typically one sequence acts as a reference sequence, to which test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are entered into a computer, subsequence coordinates are designated, if necessary, and sequence algorithm program parameters are designated. Default program parameters can be used, or alternative parameters can be designated. The sequence comparison algorithm then calculates the percent sequence identities for the test sequences relative to the reference sequence, based on the program parameters.

A "comparison window", as used herein, includes reference to a segment of any one of the number of contiguous positions selected from the group consisting of from 20 to 600, usually about 50 to about 200, more usually about 100 to about 150 in which a sequence may be compared to a reference sequence of the same number of contiguous positions after the two sequences are optimally aligned. Methods of alignment of sequences for comparison are well known in the art. Optimal alignment of sequences for comparison can be conducted, *e.g.*, by the local homology algorithm of Smith and Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, by the homology alignment algorithm of Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970, by the search for similarity method of Pearson and Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988, by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), or by manual alignment and visual



inspection (see, e.g., Brent et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (ringbou ed., 2003)).

Two examples of algorithms that are suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity are the BLAST and BLAST 2.0 algorithms, which are described in Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, 1977; and Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990, respectively. Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information. This algorithm involves first identifying high scoring sequence pairs (HSPs) by identifying short words of length W in the query sequence, which either match or satisfy some positive-valued threshold score T when aligned with a word of the same length in a database sequence. T is referred to as the neighborhood word score threshold (Altschul *et al.*, *supra*). These initial neighborhood word hits act as seeds for initiating searches to find longer HSPs containing them. The word hits are extended in both directions along each sequence for as far as the cumulative alignment score can be increased. Cumulative scores are calculated using, for nucleotide sequences, the parameters M (reward score for a pair of matching residues; always > 0) and N (penalty score for mismatching residues; always < 0). For amino acid sequences, a scoring matrix is used to calculate the cumulative score. Extension of the word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score falls off by the quantity X from its maximum achieved value; the cumulative score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters W , T , and X determine the sensitivity and speed of the alignment. The BLASTN program (for nucleotide sequences) uses as defaults a wordlength (W) of 11, an expectation (E) or 10, $M=5$, $N=-4$ and a comparison of both strands. For amino acid sequences, the BLASTP program uses as defaults a wordlength of 3, and expectation (E) of 10, and the BLOSUM62 scoring matrix (see Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915, 1989) alignments (B) of 50, expectation (E) of 10, $M=5$, $N=-4$, and a comparison of both strands.

The BLAST algorithm also performs a statistical analysis of the similarity between two sequences (see, e.g., Karlin and Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787, 1993). One measure of similarity provided by the BLAST algorithm is the smallest sum probability ($P(N)$), which provides an indication of the probability by which a match between two nucleotide or amino acid sequences would occur by chance. For example, a nucleic acid



is considered similar to a reference sequence if the smallest sum probability in a comparison of the test nucleic acid to the reference nucleic acid is less than about 0.2, more preferably less than about 0.01, and most preferably less than about 0.001.

Other than percentage of sequence identity noted above, another indication that two nucleic acid sequences or polypeptides are substantially identical is that the polypeptide encoded by the first nucleic acid is immunologically cross reactive with the antibodies raised against the polypeptide encoded by the second nucleic acid, as described below. Thus, a polypeptide is typically substantially identical to a second polypeptide, for example, where the two peptides differ only by conservative substitutions. Another indication that two nucleic acid sequences are substantially identical is that the two molecules or their complements hybridize to each other under stringent conditions, as described below. Yet another indication that two nucleic acid sequences are substantially identical is that the same primers can be used to amplify the sequence.

The term "operably linked" refers to a functional relationship between two or more polynucleotide (e.g., DNA) segments. Typically, it refers to the functional relationship of a transcriptional regulatory sequence to a transcribed sequence. For example, a promoter or enhancer sequence is operably linked to a coding sequence if it stimulates or modulates the transcription of the coding sequence in an appropriate host cell or other expression system. Generally, promoter transcriptional regulatory sequences that are operably linked to a transcribed sequence are physically contiguous to the transcribed sequence, i.e., they are cis-acting. However, some transcriptional regulatory sequences, such as enhancers, need not be physically contiguous or located in close proximity to the coding sequences whose transcription they enhance.

The term "vector" is intended to refer to a polynucleotide molecule capable of transporting another polynucleotide to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments may be ligated. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments may be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (e.g., bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (e.g., non-episomal mammalian vectors) can be integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome.

Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "recombinant expression vectors" (or simply, "expression vectors"). In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" may be used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors, such as viral vectors (e.g., replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses), which serve equivalent functions.

The term "recombinant host cell" (or simply "host cell") refers to a cell into which a recombinant expression vector has been introduced. It should be understood that such terms are intended to refer not only to the particular subject cell but to the progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term "host cell" as used herein.

The term "inflammatory disease or condition" refers to any condition characterized by local inflammation at a site of injury or infection and includes autoimmune diseases, certain forms of infectious inflammatory states, undesirable neutrophil activity characteristic of organ transplants or other implants and virtually any other condition characterized by unwanted neutrophil accumulation at a local tissue site. These conditions include but are not limited to meningitis, cerebral edema, arthritis, nephritis, adult respiratory distress syndrome, pancreatitis, myositis, neuritis, connective tissue diseases, phlebitis, arteritis, vasculitis, allergy, anaphylaxis, ehrlichiosis, gout, organ transplants and/or ulcerative colitis.

The term "subject" includes human and non-human animals. Non-human animals include all vertebrates, e.g., mammals and non-mammals, such as non-human primates, sheep, dog, cow, chickens, amphibians, and reptiles. Except when noted, the terms "patient" or "subject" are used herein interchangeably.

The term "treating" includes the administration of compounds or agents to prevent or delay the onset of the symptoms, complications, or biochemical indicia of a disease (e.g., an allergic inflammatory disease), alleviating the symptoms or arresting or inhibiting further development of the disease, condition, or disorder. Treatment may be prophylactic (to prevent or delay the onset of the disease, or to prevent the manifestation of clinical or



subclinical symptoms thereof) or therapeutic suppression or alleviation of symptoms after the manifestation of the disease.

The phrase “signal transduction pathway” or “signaling pathway” (e.g., the TSLP signaling pathway) refers to at least one biochemical reaction, but more commonly a series of biochemical reactions, which result from interaction of a cell with a stimulatory compound or agent. Thus, the interaction of a stimulatory compound (e.g., TSLP) with a cell generates a “signal” that is transmitted through the signal transduction pathway, ultimately resulting in a cellular response, e.g., an immune response.

II. Antagonist Antibodies against Human TSLPR

1. Overview

The invention provides antibodies that specifically bind to human TSLPR. These anti-hTSLPR antibodies are capable of antagonizing TSLP mediated signaling activities, e.g., TSLP mediated cell proliferation as described in the Examples below. General methods for preparation of monoclonal or polyclonal antibodies are well known in the art. See, e.g., Harlow & Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1998; Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497, 1975; Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4:72, 1983; and Cole *et al.*, pp. 77-96 in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, 1985.

Preferably, the anti-hTSLPR antibodies of the invention are monoclonal. Monoclonal antibodies refer to antibodies derived from a single clone. Any technique for producing monoclonal antibody can be employed to produce anti-hTSLPR antibodies of the invention, e.g., viral or oncogenic transformation of B lymphocytes. One animal system for preparing hybridomas is the murine system. Hybridoma production in the mouse is a very well-established procedure. As illustrated in the Examples below, monoclonal anti-hTSLPR antibodies can be generated by immunizing a non-human animal (e.g., mouse) with an hTSLPR polypeptide, or a fragment, fusion protein, or variant thereof. B cells isolated from the animal are then fused to myeloma cells to generate antibody-producing hybridomas. Monoclonal mouse anti-hTSLPR antibodies can be obtained by screening the hybridomas in an ELISA assay using an hTSLPR polypeptide or fusion protein. Immunization protocols and techniques for isolation of immunized splenocytes for fusion are known in the art.

Fusion partners (*e.g.*, murine myeloma cells) and fusion procedures are also well known in the art, *e.g.*, Harlow & Lane, *supra*.

Antibodies interact with target antigens predominantly through amino acid residues that are located in the six heavy and light chain complementarity determining regions (CDR's). Typically, the anti-hTSLPR antibodies of the invention have at least one of their heavy chain CDR sequences or light chain CDR sequences identical to the CDR sequences set forth in SEQ.I.D.NO:1,2,3,4,5 and 6. Some anti-hTSLPR antibodies of the invention have variable regions of the heavy chain and light chain respectively identical to the sequences set forth in SEQ.I.D.NO:7 and 8.

The anti-hTSLPR antibodies of the invention can be an intact antibody which contains two heavy chains and two light chains. They can also be antigen-binding fragments of an intact antibody or single chain antibodies. The anti-hTSLPR antibodies of the invention include antibodies produced in a non-human animal. They also include modified antibodies which are modified forms of the anti-hTSLPR antibody set forth herein. Often, the modified antibodies are recombinant antibodies which have similar or improved properties relative to that of the exemplified mouse antibody. For example, the mouse anti-hTSLPR antibody exemplified in the Examples below can be modified by deleting the constant region and replacing it with a different constant region that can lead to increased half-life, *e.g.*, serum half-life, stability or affinity of the antibody. The modified antibodies can be created, *e.g.*, by constructing expression vectors that include the CDR sequences from the mouse antibody grafted onto framework sequences from a different antibody with different properties (Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321, 522-525). Such framework sequences can be obtained from public DNA databases.

Some of the modified antibodies are chimeric antibodies which contain partial human immunoglobulin sequences (*e.g.*, constant regions) and partial non-human immunoglobulin sequences. Some other modified antibodies are humanized antibodies. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source that is non-human. Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art, *e.g.*, U.S. Pat. Nos. 5,585,089 and 5,693,762; Jones *et al.*, *Nature* 321: 522-25, 1986; Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323-27, 1988; and Verhoeyen *et al.*, *Science* 239: 1534-36, 1988. These methods can be readily employed to generate humanized anti-hTSLPR antibodies of the invention by substituting at least a portion of a CDR from a non-human anti-



hTSLPR antibody for the corresponding regions of a human antibody. In some embodiments, the humanized anti-hTSLPR antibodies of the invention have all three CDRs in each immunoglobulin chain (i.e. SEQ.I.D.NO:1,2,3,4,5 and 6) grafted into corresponding human framework regions.

The anti-hTSLPR antibodies described above can undergo non-critical amino-acid substitutions, additions or deletions in both the variable and constant regions without loss of binding specificity or effector functions, or intolerable reduction of binding affinity. Usually, antibodies incorporating such alterations exhibit substantial sequence identity to a reference antibody from which they were derived. For example, the mature light chain variable regions of some of the anti-hTSLPR antibodies of the invention have at least 75% or at least 85% (e.g. at least 90% such as 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% , 99%) sequence identity to the sequence of the mature light chain variable region of the anti-hTSLPR antibody set forth in SEQ.I.D.NO:8. Similarly, the mature heavy chain variable regions of the antibodies typically show at least 75% or at least 85% (e.g. at least 90% such as 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% , 99%) sequence identity to the sequence of the mature heavy chain variable region of the anti-hTSLPR antibody set forth in SEQ.I.D.NO:7.

2. Human anti-hTSLPR antibodies

Also included in the invention are fully human antibodies that exhibit the same binding specificity and comparable or better binding affinity. For example, the human antibodies can have the same or better binding characteristics relative to that of a reference human antibody which contains a heavy chain variable region sequence of SEQ ID NO: 7 and a light chain variable region sequence of SEQ ID NO: 8. Compared to the chimeric or humanized antibodies, the human anti-hTSLPR antibodies of the invention have further reduced antigenicity when administered to human subjects.

The human anti-hTSLPR antibodies can be generated using methods that are known in the art. For example, an in vivo method for replacing a nonhuman antibody variable region with a human variable region in an antibody while maintaining the same or providing better binding characteristics relative to that of the nonhuman antibody has been disclosed in U.S. Patent Application Ser. No. 10/778,726 (Publication No. 20050008625). The method

37

relies on epitope guided replacement of variable regions of a non-human reference antibody with a fully human antibody. The resulting human antibody is generally unrelated structurally to the reference nonhuman antibody, but binds to the same epitope on the same antigen as the reference antibody. Briefly, the serial epitope-guided complementarity replacement approach is enabled by setting up a competition in cells between a "competitor" and a library of diverse hybrids of the reference antibody ("test antibodies") for binding to limiting amounts of antigen in the presence of a reporter system which responds to the binding of test antibody to antigen. The competitor can be the reference antibody or derivative thereof such as a single-chain Fv fragment. The competitor can also be a natural or artificial ligand of the antigen which binds to the same epitope as the reference antibody. The only requirements of the competitor are that it binds to the same epitope as the reference antibody, and that it competes with the reference antibody for antigen binding. The test antibodies have one antigen-binding V-region in common from the nonhuman reference antibody, and the other V-region selected at random from a diverse source such as a repertoire library of human antibodies. The common V-region from the reference antibody serves as a guide, positioning the test antibodies on the same epitope on the antigen, and in the same orientation, so that selection is biased toward the highest antigen-binding fidelity to the reference antibody.

Many types of reporter system can be used to detect desired interactions between test antibodies and antigen. For example, complementing reporter fragments may be linked to antigen and test antibody, respectively, so that reporter activation by fragment complementation only occurs when the test antibody binds to the antigen. When the test antibody- and antigen-reporter fragment fusions are co-expressed with a competitor, reporter activation becomes dependent on the ability of the test antibody to compete with the competitor, which is proportional to the affinity of the test antibody for the antigen. Other reporter systems that can be used include the reactivator of an auto-inhibited reporter reactivation system (RAIR) as disclosed in U.S. Patent Application Ser. No. 10/208,730 (Publication No. 20030198971), or competitive activation system disclosed in U.S. Patent Application Ser. No. 10/076,845 (Publication No. 20030157579).

With the serial epitope-guided complementarity replacement system, selection is made to identify cells expresses a single test antibody along with the competitor, antigen, and

reporter components. In these cells, each test antibody competes one-on-one with the competitor for binding to a limiting amount of antigen. Activity of the reporter is proportional to the amount of antigen bound to the test antibody, which in turn is proportional to the affinity of the test antibody for the antigen and the stability of the test antibody. Test antibodies are initially selected on the basis of their activity relative to that of the reference antibody when expressed as the test antibody. The result of the first round of selection is a set of "hybrid" antibodies, each of which is comprised of the same non-human V-region from the reference antibody and a human V-region from the library, and each of which binds to the same epitope on the antigen as the reference antibody. One or more of the hybrid antibodies selected in the first round will have an affinity for the antigen comparable to or higher than that of the reference antibody.

In the second V-region replacement step, the human V-regions selected in the first step are used as guide for the selection of human replacements for the remaining non-human reference antibody V-region with a diverse library of cognate human V-regions. The hybrid antibodies selected in the first round may also be used as competitors for the second round of selection. The result of the second round of selection is a set of fully human antibodies which differ structurally from the reference antibody, but which compete with the reference antibody for binding to the same antigen. Some of the selected human antibodies bind to the same epitope on the same antigen as the reference antibody. Among these selected human antibodies, one or more binds to the same epitope with an affinity which is comparable to or higher than that of the reference antibody.

Using one of the mouse or chimeric anti-hTSLPR antibodies described above as the reference antibody, this method can be readily employed to generate human antibodies that bind to human TSLPR with the same binding specificity and the same or better binding affinity. In addition, such human anti-hTSLPR antibodies can also be commercially obtained from companies which customarily produce human antibodies, e.g., KaloBios, Inc. (Mountain View, CA).

4. Other types of anti-hTSLPR antibodies

The anti-hTSLPR antibodies of the invention also include single chain antibodies, bispecific antibodies and multi-specific antibodies. In some embodiments, the antibodies of the invention are single chain antibodies. Single chain antibodies contain in a single stably-

folded polypeptide chain the antigen-binding regions from both the heavy chain and the light chain. As such, single chain antibodies typically retain the binding specificity and affinity of monoclonal antibodies but are of considerably small size than classical immunoglobulins. For certain applications, the anti-hTSLPR single chain antibodies of the invention may provide many advantageous properties as compared to an intact anti-hTSLPR antibody. These include, e.g., faster clearance from the body, greater tissue penetration for both diagnostic imaging and therapy, and a significant decrease in immunogenicity when compared with mouse-based antibodies. Other potential benefits of using single chain antibodies include enhanced screening capabilities in high throughput screening methods and the potential for non-parenteral application.

Single chain anti-hTSLPR antibodies of the invention can be prepared using methods that have been described in the art. Examples of such techniques include those described in U.S. Pat. Nos. 4,946,778 and 5,258,498; Huston *et al.*, *Methods in Enzymology* 203:46-88, 1991; Shu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7995-7999, 1993; and Skerra *et al.*, *Science* 240:1038-1040, 1988.

In some embodiments, the invention provides anti-hTSLPR antibodies derivatized or linked to another functional molecule to generate a bispecific or multispecific molecule which binds to multiple binding sites or target epitopes. The functional molecule includes another peptide or protein (*e.g.*, a cytokine, a cytotoxic agent, an immune stimulatory or inhibitory agent, a Fab' fragment or other antibody binding fragment as discussed above). For example, an anti-hTSLPR antibody or antigen-binding portion thereof can be functionally linked (*e.g.*, by chemical coupling, genetic fusion, noncovalent association or otherwise) to one or more other binding molecules, such as another antibody, antibody fragment, peptide or binding mimetic. Thus, the bispecific and multispecific anti-hTSLPR antibodies of the invention comprises at least one monoclonal anti-hTSLPR antibody or antigen binding fragment thereof with a first binding specificity for human TSLPR and a second binding specificity for a second target epitope. The second target epitope can be an Fc receptor, *e.g.*, human FcγRI or a human Fcγ receptor. Therefore, the invention includes bispecific and multispecific molecules capable of binding both to FcγRI, FcγR or FcεR expressing effector cells (*e.g.*, monocytes, macrophages or polymorphonuclear cells (PMNs)), and to target cells expressing human TSLPR (*e.g.*, human CD11c+ dendritic cells). These multi-specific (*e.g.*, bispecific or multispecific) molecules target human TSLPR expressing cells to effector cells,

36

and trigger Fc receptor-mediated effector cell activities, such as phagocytosis of a human TSLPR-expressing cells, antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), cytokine release, or generation of superoxide anion.

Bispecific and multispecific anti-hTSLPR molecules of the present invention can be made by methods that have been described in the art. These include chemical techniques (see, e.g., Kranz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5807, 1981), polydoma techniques (see, e.g., U.S. Patent No. 4,474,893), or recombinant DNA techniques. Bispecific and multispecific molecules of the present invention can also be prepared by conjugating the constituent binding specificities, e.g., the anti-FcR and anti-human TSLPR binding specificities, using methods known in the art and as described herein. For example, each binding specificity of the bispecific and multispecific molecule can be generated separately and then conjugated to one another. When the binding specificities are proteins or peptides, a variety of coupling or cross-linking agents can be used for covalent conjugation. Examples of cross-linking agents include protein A, carbodiimide, N-succinimidyl-S-acetyl-thioacetate (SATA), N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP), and sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC). When the binding specificities are antibodies (e.g., two humanized antibodies), they can be conjugated via sulfhydryl bonding of the C-terminus hinge regions of the two heavy chains. The hinge region can be modified to contain an odd number of sulfhydryl residues, e.g., one, prior to conjugation.

Binding of the bispecific and multispecific molecules to their specific targets can be confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), a radioimmunoassay (RIA), or a Western Blot Assay. Each of these assays generally detects the presence of protein-antibody complexes of particular interest by employing a labeled reagent (e.g., an antibody) specific for the complex of interest. For example, the FcR-antibody complexes can be detected using e.g., an enzyme-linked antibody or antibody fragment which recognizes and specifically binds to the antibody-FcR complexes. Alternatively, the complexes can be detected using any of a variety of other immunoassays. For example, the antibody can be radioactively labeled and used in a radioimmunoassay (RIA) (see, e.g., Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays*, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986). The radioactive isotope can be detected by such means as the use of a γ counter or a scintillation counter or by autoradiography.



III. Polynucleotides, Vectors and Host Cells for Producing Anti-hTSLPR Antibodies

The invention provides substantially purified polynucleotides (DNA or RNA) which encode polypeptides comprising segments or domains of the anti-hTSLPR antibody chains described above. Some of the polynucleotides of the invention comprise the nucleotide sequence of the heavy chain variable region shown in SEQ ID NO: 9 and/or the nucleotide sequence of the light chain variable region shown in SEQ ID NO: 10. Some other polynucleotides of the invention comprise nucleotide sequences that are substantially identical (e.g., at least 65, 80%, 95%, or 99%) to the nucleotide sequences of SEQ ID NO: 9, 10, 21, or 22. When expressed from appropriate expression vectors, polypeptides encoded by these polynucleotides are capable of exhibiting antigen binding capacity.

Also provided in the invention are polynucleotides which encode at least one CDR region and usually all three CDR regions from the heavy or light chain of the anti-hTSLPR antibody set forth above. Some other polynucleotides encode all or substantially all of the variable region sequence of the heavy chain and/or the light chain of the anti-hTSLPR antibody set forth above. For example, some of these polynucleotides encode the amino acid sequence of the heavy chain variable region shown in SEQ ID NO: 7 and/or the amino acid sequence of the light chain variable region shown in SEQ ID NO: 8. Alternatively, some of these polynucleotides encode the amino acid sequence of the heavy chain variable region shown in SEQ ID NO: 21 and/or the amino acid sequence of the light chain variable region shown in SEQ ID NO: 22. Because of the degeneracy of the code, a variety of nucleic acid sequences will encode each of the immunoglobulin amino acid sequences.

The polynucleotides of the invention can encode only the variable region sequence of an anti-hTSLPR antibody. They can also cocode both a variable region and a constant region of the antibody. Some of polynucleotide sequences of the invention nucleic acids encode a mature heavy chain variable region sequence that is substantially identical (e.g., at least 80%, 90%, or 99%) to the mature heavy chain variable region sequence set forth in SEQ.I.D.NO:7 or 21. Some other polynucleotide sequences encode a mature light chain variable region sequence that is substantially identical (e.g., at least 80%, 90%, or 99%) to the mature light chain variable region sequence set forth in SEQ.I.D.NO:8 or 22. Some of the polynucleotide sequences encode a polypeptide that comprises variable regions of both the heavy chain and the light chain of the mouse antibody. Some other polynucleotides encode two polypeptide

38

segments that respectively are substantially identical to the variable regions of the heavy chain and the light chain of the mouse antibody.

The polynucleotide sequences can be produced by *de novo* solid-phase DNA synthesis or by PCR mutagenesis of an existing sequence (e.g., sequences as described in the Examples below) encoding an anti-hTSLPR antibody or its binding fragment. Direct chemical synthesis of nucleic acids can be accomplished by methods known in the art, such as the phosphotriester method of Narang et al., 1979, *Meth. Enzymol.* 68:90; the phosphodiester method of Brown et al., *Meth. Enzymol.* 68:109, 1979; the diethylphosphoramidite method of Beaucage et al., *Tetra. Lett.*, 22:1859, 1981; and the solid support method of U.S. Patent No. 4,458,066. Introducing mutations to a polynucleotide sequence by PCR can be performed as described in, e.g., *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., *Nucleic Acids Res.* 19:967, 1991; and Eckert et al., *PCR Methods and Applications* 1:17, 1991.

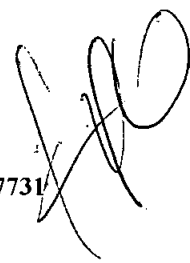
Also provided in the invention are expression vectors and host cells for producing the anti-hTSLPR antibodies described above. Various expression vectors can be employed to express the polynucleotides encoding the anti-TSLPR antibody chains or binding fragments. Both viral-based and nonviral expression vectors can be used to produce the antibodies in a mammalian host cell. Nonviral vectors and systems include plasmids, episomal vectors, typically with an expression cassette for expressing a protein or RNA, and human artificial chromosomes (see, e.g., Harrington et al., *Nat Genet.* 15:345, 1997). For example, nonviral vectors useful for expression of the anti-hTSLPR polynucleotides and polypeptides in mammalian (e.g., human) cells include pThioHis A, B & C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B & C, (Invitrogen, San Diego, CA), MPSV vectors, and numerous other vectors known in the art for expressing other proteins. Useful viral vectors include vectors based on retroviruses, adenoviruses, adenoassociated viruses, herpes viruses, vectors based on SV40, papilloma virus, HBP Epstein Barr virus, vaccinia virus vectors and Semliki Forest virus (SFV). See, Brent et al., *supra*; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49:807, 1995; and Rosenfeld et al., *Cell* 68:143, 1992.

The choice of expression vector depends on the intended host cells in which the vector is to be expressed. Typically, the expression vectors contain a promoter and other

regulatory sequences (e.g., enhancers) that are operably linked to the polynucleotides encoding an anti-hTSLPR antibody chain or fragment. In some embodiments, an inducible promoter is employed to prevent expression of inserted sequences except under inducing conditions. Inducible promoters include, e.g., arabinose, lacZ, metallothionein promoter or a heat shock promoter. Cultures of transformed organisms can be expanded under noninducing conditions without biasing the population for coding sequences whose expression products are better tolerated by the host cells. In addition to promoters, other regulatory elements may also be required or desired for efficient expression of an anti-hTSLPR antibody chain or fragment. These elements typically include an ATG initiation codon and adjacent ribosome binding site or other sequences. In addition, the efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of enhancers appropriate to the cell system in use (see, e.g., Scharf et al., *Results Probl. Cell Differ.* 20:125, 1994; and Bittner et al., *Meth. Enzymol.*, 153:516, 1987). For example, the SV40 enhancer or CMV enhancer may be used to increase expression in mammalian host cells.

The expression vectors may also provide a secretion signal sequence position to form a fusion protein with polypeptides encoded by inserted anti-hTSLPR antibody sequences. More often, the inserted anti-hTSLPR antibody sequences are linked to a signal sequences before inclusion in the vector. Vectors to be used to receive sequences encoding anti-hTSLPR antibody light and heavy chain variable domains sometimes also encode constant regions or parts thereof. Such vectors allow expression of the variable regions as fusion proteins with the constant regions thereby leading to production of intact antibodies or fragments thereof. Typically, such constant regions are human.

The host cells for harboring and expressing the anti-hTSLPR antibody chains can be either prokaryotic or eukaryotic. *E. coli* is one prokaryotic host useful for cloning and expressing the polynucleotides of the present invention. Other microbial hosts suitable for use include bacilli, such as *Bacillus subtilis*, and other enterobacteriaceae, such as *Salmonella*, *Serratia*, and various *Pseudomonas* species. In these prokaryotic hosts, one can also make expression vectors, which typically contain expression control sequences compatible with the host cell (e.g., an origin of replication). In addition, any number of a variety of well-known promoters will be present, such as the lactose promoter system, a tryptophan (trp) promoter system, a beta-lactamase promoter system, or a promoter system from phage lambda. The promoters typically control expression, optionally with an operator



sequence, and have ribosome binding site sequences and the like, for initiating and completing transcription and translation. Other microbes, such as yeast, can also be employed to express anti-hTSLPR polypeptides of the invention. Insect cells in combination with baculovirus vectors can also be used.

In some preferred embodiments, mammalian host cells are used to express and produce the anti-hTSLPR polypeptides of the present invention. For example, they can be either a hybridoma cell line expressing endogenous immunoglobulin genes (e.g., the 1D6.C9 myeloma hybridoma clone as described in the Examples) or a mammalian cell line harboring an exogenous expression vector (e.g., the SP2/0 myeloma cells exemplified below). These include any normal mortal or normal or abnormal immortal animal or human cell. For example, a number of suitable host cell lines capable of secreting intact immunoglobulins have been developed including the CHO cell lines, various Cos cell lines, HeLa cells, myeloma cell lines, transformed B-cells and hybridomas. The use of mammalian tissue cell culture to express polypeptides is discussed generally in, e.g., Winnacker, *FROM GENES TO CLONES*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Expression vectors for mammalian host cells can include expression control sequences, such as an origin of replication, a promoter, and an enhancer (see, e.g., Queen, *et al.*, *Immunol. Rev.* **89**:49-68, 1986), and necessary processing information sites, such as ribosome binding sites, RNA splice sites, polyadenylation sites, and transcriptional terminator sequences. These expression vectors usually contain promoters derived from mammalian genes or from mammalian viruses. Suitable promoters may be constitutive, cell type-specific, stage-specific, and/or modulatable or regulatable. Useful promoters include, but are not limited to, the metallothionein promoter, the constitutive adenovirus major late promoter, the dexamethasone-inducible MMTV promoter, the SV40 promoter, the MRP polIII promoter, the constitutive MPSV promoter, the tetracycline-inducible CMV promoter (such as the human immediate-early CMV promoter), the constitutive CMV promoter, and promoter-enhancer combinations known in the art.

Methods for introducing expression vectors containing the polynucleotide sequences of interest vary depending on the type of cellular host. For example, calcium chloride transfection is commonly utilized for prokaryotic cells, whereas calcium phosphate treatment or electroporation may be used for other cellular hosts. (See generally Sambrook, *et al.*, *supra*). Other methods include, e.g., electroporation, calcium phosphate treatment, liposome-mediated transformation, injection and microinjection, ballistic methods, virosomes,

immunoliposomes, polycation:nucleic acid conjugates, naked DNA, artificial virions, fusion to the herpes virus structural protein VP22 (Elliot and O'Hare, *Cell* 88:223, 1997), agent-enhanced uptake of DNA, and *ex vivo* transduction. For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression will often be desired. For example, cell lines which stably express anti-hTSLPR antibody chains or binding fragments can be prepared using expression vectors of the invention which contain viral origins of replication or endogenous expression elements and a selectable marker gene. Following the introduction of the vector, cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched media before they are switched to selective media. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to selection, and its presence allows growth of cells which successfully express the introduced sequences in selective media. Resistant, stably transfected cells can be proliferated using tissue culture techniques appropriate to the cell type.

IV. Properties of the Anti-hTSLPR Antibodies

Once an anti-hTSLPR antibody described above is expressed from an expression vector in a host cell or endogenously in a hybridoma, they can be readily purified from culture media and host cells. Usually, antibody chains are expressed with signal sequences and are thus released to the culture media. However, if antibody chains are not naturally secreted by host cells, the antibody chains can be released by treatment with mild detergent. Antibody chains can then be purified by conventional methods including ammonium sulfate precipitation, affinity chromatography to immobilized target, column chromatography, gel electrophoresis and the like. These methods are all well known and routinely practiced in the art, e.g., Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, NY, 1982; and Harlow & Lane, *supra*.

By way of example, selected hybridomas expressing anti-hTSLPR antibodies of the invention can be grown in two-liter spinner-flasks for monoclonal antibody purification. Supernatants can be filtered and concentrated before affinity chromatography with protein A-sepharose or protein G-sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ). Eluted IgG can be checked by gel electrophoresis and high performance liquid chromatography to ensure purity. The buffer solution can be exchanged into PBS, and the concentration can be determined by OD280 reading. The monoclonal antibodies can be aliquoted and stored at -80°C.

Irrespective of their method of preparation, the anti-hTSLPR monoclonal antibodies of the present invention bind specifically to hTSLPR or an antigenic fragment thereof. Specific binding exists when the dissociation constant for antibody binding to hTSLPR or an antigenic fragment thereof is $\leq 1 \mu\text{M}$, preferably $\leq 100 \text{ nM}$, and most preferably $\leq 1 \text{ nM}$. The ability of an antibody to bind to hTSLPR can be detected by labelling the antibody of interest directly, or the antibody may be unlabelled and binding detected indirectly using various sandwich assay formats. See, e.g., Harlow & Lane, *supra*. Antibodies having such binding specificity are more likely to share the advantageous properties exhibited by the 1D6.C9 mouse anti-hTSLPR antibody discussed in the Examples below.

The anti-TSLPR monoclonal antibodies of the invention are capable of antagonizing the signaling activities mediated by TSLP. These activities include, e.g., secretion of $\text{T}_\text{H}2$ -attracting chemokines by dendritic cells such as TARC and MDC; activation of dendritic cells, naïve $\text{CD}4^+$ T cell expansion and polarization to a $\text{T}_\text{H}2$ phenotype, production of pro-allergic cytokines such as IL-4, IL-5, IL-13 $\text{TNF}\alpha$. A number of assays can be employed to determine whether an anti-hTSLPR antibody can inhibit TSLP mediated cellular activities. These include, e.g., any of the assays described in the Examples such as the cell proliferation assay using Ba/F3/hTSLPR/hIL7R α cells, the luciferase reporter assay using Ba/F3/hTSLPR/IL7R α /Stat5-Luc cells, and the TARC secretion assay. Additional assays for measuring TSLP signaling activities have also been described in the art. See, e.g., Reche et al., *J. Immunol.*, 167:336-43, 2001; and Isaksen et al., *J Immunol.* 168:3288-94, 2002.

In some embodiments, the anti-hTSLPR antibodies of the invention block or compete with binding of a reference anti-hTSLPR antibody having variable region sequences set forth in SEQ.I.D.NO:7 and to an hTSLPR polypeptide. These can be fully human anti-hTSLPR antibodies described above. They can also be other mouse, chimeric or humanized anti-hTSLPR antibodies which bind to the same epitope as the reference antibody. The capacity to block or compete with the reference antibody binding indicates that an anti-hTSLPR antibody under test binds to the same or similar epitope as that defined by the reference antibody, or to an epitope which is sufficiently proximal to the epitope bound by the reference anti-hTSLPR antibody. Such antibodies are especially likely to share the advantageous properties identified for the reference antibody. The capacity to block or compete with the reference antibody may be determined by, e.g., a competition binding assay. With a competition binding assay, the antibody under test is examined for ability to

inhibit specific binding of the reference antibody to a common antigen, such as a TSLPR polypeptide. A test antibody competes with the reference antibody for specific binding to the antigen if an excess of the test antibody substantially inhibits binding of the reference antibody. Substantial inhibition means that the test antibody reduces specific binding of the reference antibody usually by at least 10%, 25%, 50%, 75%, or 90%.

There are a number of known competition binding assays that can be used to assess competition of an anti-hTSLPR antibody with the reference anti-hTSLPR antibody for binding to human TSLPR. These include, e.g., solid phase direct or indirect radioimmunoassay (RIA), solid phase direct or indirect enzyme immunoassay (EIA), sandwich competition assay (see Stahl et al., *Methods in Enzymology* 9:242-253, 1983); solid phase direct biotin-avidin EIA (see Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614-3619, 1986); solid phase direct labeled assay, solid phase direct labeled sandwich assay (see Harlow & Lane, *supra*); solid phase direct label RIA using I-125 label (see Morel et al., *Molec. Immunol.* 25:7-15, 1988); solid phase direct biotin-avidin EIA (Cheung et al., *Virology* 176:546-552, 1990); and direct labeled RIA (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77-82, 1990). Typically, such an assay involves the use of purified antigen bound to a solid surface or cells bearing either of these, an unlabelled test anti-hTSLPR antibody and a labelled reference antibody. Competitive inhibition is measured by determining the amount of label bound to the solid surface or cells in the presence of the test antibody. Usually the test antibody is present in excess. Antibodies identified by competition assay (competing antibodies) include antibodies binding to the same epitope as the reference antibody and antibodies binding to an adjacent epitope sufficiently proximal to the epitope bound by the reference antibody for steric hindrance to occur.

To determine if the selected anti-TSLPR monoclonal antibodies bind to unique epitopes, each antibody can be biotinylated using commercially available reagents (e.g., reagents from Pierce, Rockford, IL). Competition studies using unlabeled monoclonal antibodies and biotinylated monoclonal antibodies can be performed using a TSLPR polypeptide coated-ELISA plates. Biotinylated MAb binding can be detected with a strep-avidin-alkaline phosphatase probe. To determine the isotype of a purified anti-TSLPR antibody, isotype ELISAs can be performed. For example, wells of microtiter plates can be coated with 1 µg/ml of anti-human IgG overnight at 4°C. After blocking with 1% BSA, the plates are reacted with 1 µg/ml or less of the monoclonal anti-hTSLPR antibody or purified

isotype controls, at ambient temperature for one to two hours. The wells can then be reacted with either human IgG1 or human IgM-specific alkaline phosphatase-conjugated probes. Plates are then developed and analyzed so that the isotype of the purified antibody can be determined.

To demonstrate binding of monoclonal anti-hTSLPR antibodies to live cells expressing an hTSLPR polypeptide, flow cytometry can be used. Briefly, cell lines expressing hTSLPR (grown under standard growth conditions) can be mixed with various concentrations of an anti-hTSLPR antibody in PBS containing 0.1% BSA and 10% fetal calf serum, and incubated at 37°C for 1 hour. After washing, the cells are reacted with Fluorescein-labeled anti-human IgG antibody under the same conditions as the primary antibody staining. The samples can be analyzed by FACScan instrument using light and side scatter properties to gate on single cells. An alternative assay using fluorescence microscopy may be used (in addition to or instead of) the flow cytometry assay. Cells can be stained exactly as described above and examined by fluorescence microscopy. This method allows visualization of individual cells, but may have diminished sensitivity depending on the density of the antigen.

Anti-hTSLPR antibodies of the invention can be further tested for reactivity with an hTSLPR polypeptide or antigenic fragment by Western blotting. Briefly, purified hTSLPR polypeptides or fusion proteins, or cell extracts from cells expressing TSLPR can be prepared and subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. After electrophoresis, the separated antigens are transferred to nitrocellulose membranes, blocked with 10% fetal calf serum, and probed with the monoclonal antibodies to be tested. Human IgG binding can be detected using anti-human IgG alkaline phosphatase and developed with BCIP/NBT substrate tablets (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

V. Non-Immunoglobulin Scaffolds

A wide variety of antibody/ immunoglobulin frameworks or scaffolds can be employed so long as the resulting polypeptide includes at least one binding region which is specific for the target protein. Such frameworks or scaffolds include the 5 main idiotypes of human immunoglobulins, or fragments thereof (such as those disclosed elsewhere herein), and include immunoglobulins of other animal species, preferably having humanized aspects. Single heavy-chain antibodies such as those identified in camelids are of particular interest in

this regard. Novel frameworks, scaffolds and fragments continue to be discovered and developed by those skilled in the art.

In one aspect, the invention pertains to generating non-immunoglobulin based antibodies using non- immunoglobulin scaffolds onto which CDRs of the invention can be grafted. Known or future non-immunoglobulin frameworks and scaffolds may be employed, as long as they comprise a binding region specific for the target protein. Such compounds are known herein as “polypeptides comprising a target-specific binding region”. Known non-immunoglobulin frameworks or scaffolds include, but are not limited to, Adnectins (fibronectin) (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), ankyrin (Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland), domain antibodies (Domantis, Ltd (Cambridge, MA) and Ablynx nv (Zwijnaarde, Belgium)), lipocalin (Anticalin) (Pieris Proteolab AG, Freising, Germany), small modular immuno-pharmaceuticals (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxybodies (Avidia, Inc. (Mountain View, CA)), Protein A (Affibody AG, Sweden) and affilin (gamma-crystallin or ubiquitin) (Scil Proteins GmbH, Halle, Germany).

(i) Adnectins – Compound Therapeutics

The adnectin scaffolds are based on fibronectin type III domain (e.g., the tenth module of the fibronectin type III (10 Fn3 domain). The fibronectin type III domain has 7 or 8 beta strands which are distributed between two beta sheets, which themselves pack against each other to form the core of the protein, and further containing loops (analogous to CDRs) which connect the beta strands to each other and are solvent exposed. There are at least three such loops at each edge of the beta sheet sandwich, where the edge is the boundary of the protein perpendicular to the direction of the beta strands. (US 6,818,418).

These fibronectin-based scaffolds are not an immunoglobulin, although the overall fold is closely related to that of the smallest functional antibody fragment, the variable region of the heavy chain, which comprises the entire antigen recognition unit in camel and llama IgG. Because of this structure, the non-immunoglobulin antibody mimics antigen binding properties that are similar in nature and affinity to those of antibodies. These scaffolds can be used in a loop randomization and shuffling strategy in vitro that is similar to the process of affinity maturation of antibodies in vivo. These fibronectin-based molecules can be used as

46

scaffolds where the loop regions of the molecule can be replaced with CDRs of the invention using standard cloning techniques.

(ii) Ankyrin – Molecular Partners

The technology is based on using proteins with ankyrin derived repeat modules as scaffolds for bearing variable regions which can be used for binding to different targets. The ankyrin repeat module is a 33 amino acid polypeptide consisting of two anti-parallel α -helices and a β -turn. Binding of the variable regions is mostly optimized by using ribosome display.

(iii) Maxybodies/Avimers - Avidia

Avimers are derived from natural A-domain containing protein such as LRP-1. These domains are used by nature for protein-protein interactions and in human over 250 proteins are structurally based on A-domains. Avimers consist of a number of different "A-domain" monomers (2-10) linked via amino acid linkers. Avimers can be created that can bind to the target antigen using the methodology described in, for example, 20040175756; 20050053973; 20050048512; and 20060008844.

(vi) Protein A – Affibody

Affibody® affinity ligands are small, simple proteins composed of a three-helix bundle based on the scaffold of one of the IgG-binding domains of Protein A. Protein A is a surface protein from the bacterium *Staphylococcus aureus*. This scaffold domain consists of 58 amino acids, 13 of which are randomized to generate Affibody® libraries with a large number of ligand variants (See e.g., US 5,831,012). Affibody® molecules mimic antibodies, they have a molecular weight of 6 kDa, compared to the molecular weight of antibodies, which is 150 kDa. In spite of its small size, the binding site of Affibody® molecules is similar to that of an antibody.

(v) Anticalins – Pieris

Anticalins® are products developed by the company Pieris ProteoLab AG. They are derived from lipocalins, a widespread group of small and robust proteins that are usually involved in the physiological transport or storage of chemically sensitive or insoluble compounds. Several natural lipocalins occur in human tissues or body liquids.



The protein architecture is reminiscent of immunoglobulins, with hypervariable loops on top of a rigid framework. However, in contrast with antibodies or their recombinant fragments, lipocalins are composed of a single polypeptide chain with 160 to 180 amino acid residues, being just marginally bigger than a single immunoglobulin domain.

The set of four loops, which makes up the binding pocket, shows pronounced structural plasticity and tolerates a variety of side chains. The binding site can thus be reshaped in a proprietary process in order to recognize prescribed target molecules of different shape with high affinity and specificity.

One protein of lipocalin family, the bilin-binding protein (BBP) of *Pieris Brassicae* has been used to develop anticalins by mutagenizing the set of four loops. One example of a patent application describing "anticalins" is PCT WO 199916873.

(vi) Affilin – Scil Proteins

Affilin™ molecules are small non-immunoglobulin proteins which are designed for specific affinities towards proteins and small molecules. New Affilin™ molecules can be very quickly selected from two libraries, each of which is based on a different human derived scaffold protein. Affilin™ molecules do not show any structural homology to immunoglobulin proteins. Scil Proteins employs two Affilin™ scaffolds, one of which is gamma crystalline, a human structural cytochrome protein and the other is "ubiquitin" superfamily proteins. Both human scaffolds are very small, show high temperature stability and are almost resistant to pH changes and denaturing agents. This high stability is mainly due to the expanded beta sheet structure of the proteins. Examples of gamma crystalline derived proteins are described in WO200104144 and examples of "ubiquitin-like" proteins are described in WO2004106368.

VI. Therapeutical Applications of the Anti-hTSLPR Antibodies

The anti-hTSLPR antibodies can be employed in many therapeutic or prophylactic applications by inhibiting TSLP signaling activities. These include treating diseases or conditions mediated by TSLP signaling, such as those affecting B-cell development, T-cell development, T-cell receptor gene rearrangement, or regulation of the Stat5 transcription factor. For example, the anti-hTSLPR antagonist antibodies can be employed to suppress or reduce undesired immune response mediated by TH2 cell. In particular, they are suitable for

treating human patients suffering from allergic inflammatory disorders associated with or mediated by TSLP signaling. Allergic inflammatory diseases that are amenable to treatment with the anti-hTSLPR antibodies of the invention include, e.g., (1) asthma, a chronic inflammatory disease of the airways associated with airflow obstruction and bronchial hyper-responsiveness; (2) atopic dermatitis, a chronic, exacerbating inflammatory skin disease requiring long-term intermittent treatment; and (3) allergic rhinitis, an inflammatory disorder of the nasal mucosa, mediated by T_H2 lymphocytes which are linked to atopy. In the U.S. and several major European countries, the diagnosed prevalence for asthma, atopic dermatitis and allergic rhinitis is expected to increase from 46 million at present to 53 million, from 31.7 million at present to 37.2 million, and from 55.9 million at present to 64.5 million in 2013, respectively. About 50 to 80 percent of patients with atopic dermatitis have or will develop asthma or allergic rhinitis.

Most drugs currently available for treating allergies are aimed at providing symptomatic relief while there is relatively little effort in the immunomodulation field likely to provide long term disease modification. The anti-hTSLPR antibodies of the invention can provide novel and effective treatment of subjects (esp., human patients) suffering from any of these allergic diseases. By preventing TSLP from activating the TSLP receptor signal transduction pathway, they can block the T_H2 response and the production of cytokines responsible for both initiation and maintenance of allergic inflammation. Hence this approach has the potential to induce a long term therapeutic effect and disease modifying benefit in patients with atopic dermatitis, asthma and allergic rhinitis.

In another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition having at least one of any of the above antibodies or functional fragments or conservative variants, and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient therefor.

In certain embodiments, the invention provides a method for treating a disorder or condition associated with the presence of a cell having a receptor target hTSLP. The method involves administering to a subject in need thereof an effective amount of any of the above pharmaceutical compositions. In a related embodiment, the disorder or condition to be treated is a respiratory disorder.

In another embodiment, the disorder or condition to be treated is bronchial asthma, which is a common persistent inflammatory disease of the lung characterised by airways

hyper-responsiveness (AHR), mucus overproduction, fibrosis and raised serum IgE levels.

In another embodiment, the disorder or condition to be treated is atopic (allergic) dermatitis, which is the most common skin disease in childhood and is characterized by intense pruritus and chronic eczematous plaques.

In another embodiment, the disorder or condition to be treated is selected from other inflammatory or obstructive airways diseases and conditions such as COPD, acute lung injury (ALI), acute/adult respiratory distress syndrome (ARDS), dyspnea, allergic airway inflammation, small airway disease, lung carcinoma, acute chest syndrome in patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension, as well as exacerbation of airways hyperreactivity consequent to other drug therapy, in particular other inhaled drug therapy.

In another embodiment, the disorder or condition to be treated is bronchitis of whatever type or genesis including, e.g., acute, arachidic, catarrhal, croupus, chronic or phthinoid bronchitis.

In another embodiment, the disorder or condition to be treated includes pneumoconiosis (an inflammatory, commonly occupational, disease of the lungs, frequently accompanied by airways obstruction, whether chronic or acute, and occasioned by repeated inhalation of dusts) of whatever type or genesis, including, for example, aluminosis, anthracosis, asbestosis, chalicosis, ptilosis, siderosis, silicosis, tabacosis and byssinosis.

In another embodiment, the disorder or condition to be treated is selected from atopic rhinitis (hay fever) and chronic sinusitis.

In another embodiment, the disorder or condition to be treated is selected from other inflammatory conditions of the skin, for example, psoriasis or lupus erythematosus.

In another embodiment, the disorder or condition to be treated is inflammatory bowel disease, such as ulcerative colitis and Crohn's disease.

In another embodiment, the disorder or condition to be treated is selected from other fibrotic conditions, such as systemic scleriosis, liver fibrosis, pulmonary fibrosis, idiopathic pulmonary fibrosis or fibroid lung.

In another embodiment, the disorder or condition to be treated is tumour recurrence or metastasis. Inhibition of Th2 cytokines has been shown to enhance anti-viral vaccines in

50

animal models and may be beneficial in the treatment of HIV and other infectious diseases [Ahlers, J. D. , et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002].

In another embodiment, the disorder or condition to be treated is a respiratory viral infection, which exacerbates underlying chronic conditions such as asthma, chronic bronchitis, COPD, otitis media, and sinusitis. The respiratory viral infection treated may be associated with secondary bacterial infection, such as otitis media, sinusitis or pneumonia.

In another embodiment, the disorder or condition to be treated is selected from other diseases or conditions, in particular diseases or conditions having an inflammatory component, for example, diseases of the bone and joints including rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and other diseases such as atherosclerosis, multiple sclerosis, and acute and chronic allograft rejection, e.g. following transplantation of heart, kidney, liver, lung or bone marrow.

In another embodiment, the disorder or condition to be treated is endotoxic shock, glomerulonephritis, cerebral and cardiac ischemia, Alzheimer's disease, cystic fibrosis, virus infections and the exacerbations associated with them, acquired immune deficiency syndrome (AIDS), multiple sclerosis (MS), *Helicobacter pylori* associated gastritis, and cancers, particularly the growth of ovarian cancer.

In another embodiment, the disorder or condition to be treated is the symptoms caused by viral infection in a human which is caused by the human rhinovirus, other enterovirus, coronavirus, herpes viruses, influenza virus, parainfluenza virus, respiratory syncytial virus or an adenovirus.

Treatment in accordance with the present invention may be symptomatic or prophylactic.

The effectiveness of an agent of the invention in inhibiting inflammatory conditions, for example in inflammatory airways diseases, may be demonstrated in an animal model, e.g. mouse, rat or rabbit model, of airway inflammation or other inflammatory conditions, for example as described by Wada et al, *J. Exp. Med* (1994) 180:1135-40; Sekido et al, *Nature* (1993) 365:654-57; Modelska et al., *Am. J. Respir. Crit. Care. Med* (1999) 160:1450-56; and Laffon et al (1999) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160:1443-49.

51

In yet another embodiment, the invention provides a method for identifying a cell having a hTSLP receptor. This method involves contacting the cell with any of the above antibodies or antibody fragments further having a detectable label. The label is radioactive, fluorescent, magnetic, paramagnetic, or chemiluminescent. The method further can involve any of the above imaging or separating the labeled cell.

In another embodiment, any of the above human or humanized antibodies or antibody fragments are synthetic.

In another embodiment, the invention provides a pharmaceutical composition and an additional therapeutic agent.

The additional therapeutic agent can be selected from the group consisting of anti-inflammatory, bronchodilatory, antihistamine or anti-tussive drug substances, particularly in the treatment of obstructive or inflammatory airways diseases such as those mentioned hereinbefore, for example as potentiators of therapeutic activity of such drugs or as a means of reducing required dosaging or potential side effects of such drugs. A therapeutic agent of the invention may be mixed with the other drug substance in a fixed pharmaceutical composition or it may be administered separately, before, simultaneously with or after the other drug substance. Accordingly the invention includes a combination of an agent of the invention as hereinbefore described with an anti-inflammatory, bronchodilatory, antihistamine or anti-tussive drug substance, said agent of the invention and said drug substance being in the same or different pharmaceutical composition.

Suitable anti-inflammatory drugs include steroids, in particular glucocorticosteroids such as budesonide, beclamethasone dipropionate, fluticasone propionate, ciclesonide or mometasone furoate, or steroids described in WO 02/88167, WO 02/12266, WO 02/100879, WO 02/00679 (especially those of Examples 3, 11, 14, 17, 19, 26, 34, 37, 39, 51, 60, 67, 72, 73, 90, 99 and 101), WO 03/35668, WO 03/48181, WO 03/62259, WO 03/64445, WO 03/72592, WO 04/39827 and WO 04/66920; non-steroidal glucocorticoid receptor agonists, such as those described in DE 10261874, WO 00/00531, WO 02/10143, WO 03/82280, WO 03/82787, WO 03/86294, WO 03/104195, WO 03/101932, WO 04/05229, WO 04/18429, WO 04/19935 and WO 04/26248; LTB₄ antagonists such as BIIL 284, CP-195543, DPC11870, LTB₄ ethanolamide, LY 293111, LY 255283, CGS025019C, CP-195543, ONO-4057, SB 209247, SC-53228 and those described in US 5451700; LTD₄



antagonists such include montelukast, pranlukast, zafirlukast, accolate, SR2640, Wy-48,252, ICI 198615, MK-571, LY-171883, Ro 24-5913 and L-648051; PDE4 inhibitors such cilomilast (Ariflo® GlaxoSmithKline), Roflumilast (Byk Gulden), V-11294A (Napp), BAY19-8004 (Bayer), SCH-351591 (Schering-Plough), Arofilline (Almirall Prodesfarma), PD189659 / PD168787 (Parke-Davis), AWD-12-281 (Asta Medica), CDC-801 (Celgene), SelCID(TM) CC-10004 (Celgene), VM554/UM565 (Vernalis), T-440 (Tanabe), KW-4490 (Kyowa Hakko Kogyo), and those disclosed in WO 92/19594, WO 93/19749, WO 93/19750, WO 93/19751, WO 98/18796, WO 99/16766, WO 01/13953, WO 03/104204, WO 03/104205, WO 03/39544, WO 04/000814, WO 04/000839, WO 04/005258, WO 04/018450, WO 04/018451, WO 04/018457, WO 04/018465, WO 04/018431, WO 04/018449, WO 04/018450, WO 04/018451, WO 04/018457, WO 04/018465, WO 04/019944, WO 04/019945, WO 04/045607 and WO 04/037805; A_{2A} agonists such as those described in EP 1052264, EP 1241176, EP 409595A2, WO 94/17090, WO 96/02543, WO 96/02553, WO 98/28319, WO 99/24449, WO 99/24450, WO 99/24451, WO 99/38877, WO 99/41267, WO 99/67263, WO 99/67264, WO 99/67265, WO 99/67266, WO 00/23457, WO 00/77018, WO 00/78774, WO 01/23399, WO 01/27130, WO 01/27131, WO 01/60835, WO 01/94368, WO 02/00676, WO 02/22630, WO 02/96462, and WO 03/086408; and A_{2B} antagonists such as those described in WO 02/42298.

Suitable bronchodilatory drugs include anticholinergic or antimuscarinic agents, in particular ipratropium bromide, oxitropium bromide, tiotropium salts and CHF 4226 (Chiesi), and glycopyrrolate, but also those described in EP 424021, US 3714357, US 5171744, WO 01/04118, WO 02/00652, WO 02/51841, WO 02/53564, WO 03/00840, WO 03/33495, WO 03/53966, WO 03/87094, WO 04/018422 and WO 04/05285; and beta-2 adrenoceptor agonists such as albuterol (salbutamol), metaproterenol, terbutaline, salmeterol fenoterol, procaterol, and especially, formoterol, carmoterol and pharmaceutically acceptable salts thereof, and compounds (in free or salt or solvate form) of formula I of WO 00/75114, which document is incorporated herein by reference, preferably compounds of the Examples thereof, especially the compound (5-[(R)-2-(5,6-Diethyl-indan-2-ylamino)-1-hydroxy-ethyl]-8-hydroxy-1H-quinolin-2-one) and pharmaceutically acceptable salts thereof, as well as compounds (in free or salt or solvate form) of formula I of WO 04/16601, and also compounds of EP 1440966, JP 05025045, WO 93/18007, WO 99/64035, US 2002/0055651, WO 01/42193, WO 01/83462, WO 02/66422, WO 02/70490, WO 02/76933, WO 03/24439, WO 03/42160, WO 03/42164, WO 03/72539, WO 03/91204, WO 03/99764, WO 04/16578,

WO 04/22547, WO 04/32921, WO 04/33412, WO 04/37768, WO 04/37773, WO 04/37807, WO 04/39762, WO 04/39766, WO 04/45618 WO 04/46083 , WO 04/80964, EP1460064, WO 04/087142, WO 04/089892, EP 01477167, US 2004/0242622, US 2004/0229904, WO 04/108675, WO 04/108676, WO 05/033121, WO 05/040103 and WO 05/044787.

Suitable dual anti-inflammatory and bronchodilatory drugs include dual beta-2 adrenoceptor agonist / muscarinic antagonists such as those disclosed in US 2004/0167167, WO 04/74246 and WO 04/74812.

Suitable antihistamine drug substances include cetirizine hydrochloride, acetaminophen, clemastine fumarate, promethazine, loratidine, desloratidine, diphenhydramine and fexofenadine hydrochloride, activastine, astemizole, azelastine, ebastine, epinastine, mizolastine and tefenadine as well as those disclosed in JP 2004107299, WO 03/099807 and WO 04/026841.

Combinations of therapeutic agents of the invention and anticholinergic or antimuscarinic agents, steroids, beta-2 agonists, PDE4 inhibitors, dopamine receptor agonists, LTD4 antagonists or LTB4 antagonists may also be used. Other useful combinations of agents of the invention with anti-inflammatory drugs are those with other antagonists of chemokine receptors, e.g. CCR-1, CCR-3, CCR-4, CCR-5, CCR-6, CCR-7, CCR-8, CCR-9 and CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, particularly CCR-5 antagonists such as Schering-Plough antagonists SC-351125, SCH-55700 and SCH-D, Takeda antagonists such as N-[[4-[[[6,7-dihydro-2-(4-methylphenyl)-5H-benzocyclohepten-8-yl]carbonyl]amino]phenyl]-methyl]-tetrahydro-N,N-dimethyl-2H-pyran-4-aminium chloride (TAK-770), CCR-5 antagonists described in US 6166037 (particularly claims 18 and 19), WO 0066558 (particularly claim 8), WO 0066559 (particularly claim 9), WO 04/018425 and WO 04/026873.

The additional therapeutic agent may also be selected from the group consisting of other cytokine binding molecules, particularly antibodies of other cytokines, in particular a combination with an anti-IL4 antibody, such as described in PCT/EP2005/00836, an anti-IgE antibody, such as Xolair®, an anti-IL31 antibody, an anti-IL31R antibody, an anti-IL13 antibody, such as described in WO05/007699, an anti-endoglin antibody, an anti-IL1b antibody, an anti-TSLP antibody or another anti-hTSLPR antibody.

54

The anti-hTSLPR antagonist antibodies of the invention can be employed to treat a subject both therapeutically and prophylactically. In therapeutic applications, a composition comprising an anti-hTSLPR antagonist antibody (e.g., a humanized anti-hTSLPR antibody) is administered to a subject already affected by an allergic disease caused by or associated with TSLP signaling. The composition contains the antibody in an amount sufficient to cure, partially arrest, or detectably slow the progression of the condition, and its complications. In prophylactic applications, compositions containing the monoclonal anti-hTSLPR antibodies are administered to a patient not already suffering from an allergic inflammatory disorder. Rather, they are directed to a subject who are at the risk of, or has a predisposition, to developing an allergic inflammatory disorder. Such applications allow the subject to enhance the patient's resistance or to retard the progression of an allergic inflammatory disorder mediated by TSLP signaling.

VII. Pharmaceutical Compositions

The invention provides pharmaceutical compositions comprising the anti-hTSLPR monoclonal antibodies (intact or binding fragments) formulated together with a pharmaceutically acceptable carrier. The compositions can additionally contain other therapeutic agents that are suitable for treating or preventing a given allergic disorder, e.g., the known anti-allergy agents noted above. Pharmaceutically carriers enhance or stabilize the composition, or to facilitate preparation of the composition. Pharmaceutically acceptable carriers include solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically compatible.

A pharmaceutical composition of the present invention can be administered by a variety of methods known in the art. The route and/or mode of administration vary depending upon the desired results. It is preferred that administration be intravenous, intramuscular, intraperitoneal, or subcutaneous, or administered proximal to the site of the target. The pharmaceutically acceptable carrier should be suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous, parenteral, spinal or epidermal administration (e.g., by injection or infusion). Depending on the route of administration, the active compound, *i.e.*, antibody, bispecific and multispecific molecule, may be coated in a material to protect the compound from the action of acids and other natural conditions that may inactivate the compound.



The composition should be sterile and fluid. Proper fluidity can be maintained, for example, by use of coating such as lecithin, by maintenance of required particle size in the case of dispersion and by use of surfactants. In many cases, it is preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol or sorbitol, and sodium chloride in the composition. Long-term absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent which delays absorption, for example, aluminum monostearate or gelatin.

Pharmaceutical compositions of the invention can be prepared in accordance with methods well known and routinely practiced in the art. See, e.g., Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; and *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Pharmaceutical compositions are preferably manufactured under GMP conditions. Typically, a therapeutically effective dose or efficacious dose of the anti-hTSLPR antibody is employed in the pharmaceutical compositions of the invention. The anti-hTSLPR antibodies are formulated into pharmaceutically acceptable dosage forms by conventional methods known to those of skill in the art. Dosage regimens are adjusted to provide the optimum desired response (e.g., a therapeutic response). For example, a single bolus may be administered, several divided doses may be administered over time or the dose may be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subjects to be treated; each unit contains a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier.

Actual dosage levels of the active ingredients in the pharmaceutical compositions of the present invention can be varied so as to obtain an amount of the active ingredient which is effective to achieve the desired therapeutic response for a particular patient, composition, and mode of administration, without being toxic to the patient. The selected dosage level depends upon a variety of pharmacokinetic factors including the activity of the particular compositions of the present invention employed, or the ester, salt or amide thereof, the route of administration, the time of administration, the rate of excretion of the particular compound being employed, the duration of the treatment, other drugs, compounds and/or materials used



in combination with the particular compositions employed, the age, sex, weight, condition, general health and prior medical history of the patient being treated, and like factors.

A physician or veterinarian can start doses of the antibodies of the invention employed in the pharmaceutical composition at levels lower than that required to achieve the desired therapeutic effect and gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. In general, effective doses of the compositions of the present invention, for the treatment of an allergic inflammatory disorder described herein vary depending upon many different factors, including means of administration, target site, physiological state of the patient, whether the patient is human or an animal, other medications administered, and whether treatment is prophylactic or therapeutic. Treatment dosages need to be titrated to optimize safety and efficacy. For administration with an antibody, the dosage ranges from about 0.0001 to 100 mg/kg, and more usually 0.01 to 5 mg/kg, of the host body weight. For example dosages can be 1 mg/kg body weight or 10 mg/kg body weight or within the range of 1-10 mg/kg. An exemplary treatment regime entails administration once per every two weeks or once a month or once every 3 to 6 months.

Antibody is usually administered on multiple occasions. Intervals between single dosages can be weekly, monthly or yearly. Intervals can also be irregular as indicated by measuring blood levels of anti-hTSLPR antibody in the patient. In some methods, dosage is adjusted to achieve a plasma antibody concentration of 1–1000 µg/ml and in some methods 25–300 µg/ml. Alternatively, antibody can be administered as a sustained release formulation, in which case less frequent administration is required. Dosage and frequency vary depending on the half-life of the antibody in the patient. In general, humanized antibodies show longer half life than that of chimeric antibodies and nonhuman antibodies. The dosage and frequency of administration can vary depending on whether the treatment is prophylactic or therapeutic. In prophylactic applications, a relatively low dosage is administered at relatively infrequent intervals over a long period of time. Some patients continue to receive treatment for the rest of their lives. In therapeutic applications, a relatively high dosage at relatively short intervals is sometimes required until progression of the disease is reduced or terminated, and preferably until the patient shows partial or complete amelioration of symptoms of disease. Thereafter, the patient can be administered a prophylactic regime.

SA

In the preceding specification, reference is made primarily to embodiments of the invention as they pertain to the antibody known as NVP164-1. The reader of this specification may however assume that all equivalent embodiments are specifically and individually contemplated with regard to the antibody known as NVP163-1 and as such form embodiments of the invention which may be subject to the appended claims below.

EXAMPLES

The following examples are provided to further illustrate the invention but not to limit its scope. Other variants of the invention will be readily apparent to one of ordinary skill in the art and are encompassed by the appended claims.

1. ELISA

Proteins used for ELISA were hTSLPR/hFc (R&D systems, # 981-TR), hIL7R α /hFc (R&D systems, # 306-IR), or mTSLPR/hFc (R&D Systems, # 546-TR). Maxisorp 384-well plates (Nunc, Rochester, NY, # 464718) were coated with 25 μ L of 5 μ g/ μ L of the respective protein overnight at 4 °C. The coated plates were washed with PBS + 0.05% Tween 20 (PBST), blocked with 80 μ L of 1% BSA in PBS, and washed again with PBST. The plates were sequentially incubated with 20 μ L of, 20 μ L of HRP-conjugated goat anti-human IgG, F(ab')₂ specific antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, # 109-035-097), and 20 μ L of TMB substrate (KPL, # 50-76-05), and read at an absorbance of 650 nM. The plates were washed with PBST between incubations. See Figures 1,2,4,5 and 6.

2. Reporter Gene Assay (RGA)

Ba/F3 cells, a murine pro-B cell line, stably overexpressing hTSLPR/hIL7R α /Stat5-Luc were used for RGA. The stable cells were maintained in RPMI-1640 containing 10% FBS and 10 ng/mL hTSLP (R&D Systems, # 1398-TS/CF). The cells were washed with RPMI-1640 + 10% FBS once, resuspended at 5×10^5 cells/mL, and seeded at 20 μ L/well in a 384-well plate overnight at 5% CO₂ in a 37 °C tissue culture incubator. Prior to the addition of 10 μ L of 4x TSLP (4 ng/ μ L), 10 μ L of antibody was added to the cells and incubated for 1

56

h at 37 °C. After 6 h incubation at 37 °C, 20 µL Bright-Glo (Promega, # 2620) was added to each well, and the plate was read using a luminescence plate reader. See Figures 3,7 and 8

3. Further characterization

The TSLPR antibody referred to in WO2007/112146 as NV115-3B in that document is a Fab fragment of NV115-3B-IgG1. NV-115-3B-IgG1 is a full length IgG1 of the Fab fragment. NV-115-3B-IgG1 failed its respective primate pharmacokinetic (PK) studies due to a strong immunogenicity (see Figure 10C below), precluding a subsequent multi-dose toxicity study. The TSLPR antibody from '146 originally contained two sub-classes of human germline sequences in both the heavy and light chain sequences which the inventors speculated may give rise to this immunogenicity problem. The second generation candidate NV164-1 was generated so as to have a single subclass heavy chain and a single subclass light chain. NV164-1 showed binding specificity to human TSLPR (Figure 4), cross-reactivity to cynomolgus TSLPR (Figure 5), and comparable biological activity in *in vitro* assays (Figures 6, 7, 8, and 9). Subsequently, it was tested in a primate PK study with low and high doses (Figure 10 A and B). The PK results indicated that the higher dose (30 mg/kg) generated tolerance against potential immunogenicity, and the lower dose (5 mg/kg) induced a degree of immunogenicity but was much less immunogenic than NV115-3B-IgG1. Accordingly, it would seem that engineering antibodies to this target with a single sub-class of germline sequences has a beneficial effect on immunogenicity.

Various sequence information for NV164-1 may be found in SEQ.I.D.NO:1 to 14 below.

Various sequence information for NV163-1 may be found in SEQ.I.D.NO:15 to 24 below.



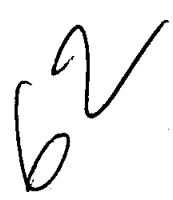
Sequence information

Amino acid sequence or polynucleotide (PN)	Sequence Identifier (SEQ.I.D.NO:)
CDRH1,	1: SYGMS
CDRH2,	2: WVNTNTGNPRYAQGFTG
CDRH3,	3: EGFIRTVVGAAGRFVY
CDRL1,	4: RASQDIHTRLA
CDRL2	5: WASTLQS
CDRL3,	6: QQYSAYPT
Heavy Chain Variable Region (VH)	7: QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTSYGMSWVRQAPGQGLEWMGWV NTNTGNPRYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREGFI RTVVGAAGRFVYWGQGLVTVSS
Light chain variable region (VL)	8: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHTRLAWYQQKPGKAPKLLIYWA STLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSAYPTFGQGTK LEIK
Heavy chain	9: MAWVWTL PFLMAAAQGVQAQVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTSY GMSWVRQAPGQGLEWMGWVNTNTGNPRYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQI SSLKAEDTAVYYCAREGFI RTVVGAAGRFVYWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
Light chain	10: MSVLTQVLALLLLWLTGTRCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIHT RLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQYSAYPTFGQGTKLEIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PN encoding SEQ.I.D.NO:7	11 CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCAGCGAGCTGAAGAAACCTGGCGCCAGC GTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACGGCATG AGCTGGGTGCGGCAGGCTCCAGGACAGGGACTGGAGTGGATGGGCTGGGTG AACACCAACACCGGCAACCCAGATACGCCACGGGCTTCACCGGCCGGTTC GTGTTTCAGCCTGGACACCAGCGTGTCCACCGCCTACCTGCAGATCAGCAGC CTGAAGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAGGGCTTCATC CGGACCGTGGTGGGAGCCGCCGAAGATTCGTGTACTGGGGCCAGGGCACC CTGGTCACCGTCTCCTCA
PN encoding SEQ.I.D.NO:8	12 GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGAC AGAGTGACCATCACCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCCACACCCGGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCC

	AGCACCCCTGCAGAGCGGCGTGCCCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGC ACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCACC TACTACTGCCAGCAGTACAGCGCCTACCCACCTTCGGCCAGGGCACCAAG CTTGAAATCAAA
N encoding EQ.I.D.NO:9	13 ATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCCATTCTGATGGCAGCTGCCCAAGGTGTC CAGGCACAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCAGCGAGCTGAAGAAACCTGGC GCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTAC GGCATGAGCTGGGTGCGGCAGGCTCCAGGACAGGGACTGGAGTGGATGGGC TGGGTGAACACCAACACCGGCAACCCCAGATACGCCCAGGGCTTCACCGGC CGGTTTCGTGTTACGCCTGGACACCAGCGTGTCCACCGCCTACCTGCAGATC AGCAGCCTGAAGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAGGGC TTCATCCGGACCGTGGTGGGAGCCGCGGAAGATTCTGTACTGGGGCCAG GGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCCATCGGTCTTC CCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC TGCTTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAATCA GGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCTGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCG TGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA
N encoding EQ.I.D.NO:10	14 ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGCGTTGCTGCTGCTGTGGCTTACAGGT ACGCGTTGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGC GTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGCCGGGCCAGCCAGGACATCCACACC CGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATC TACTGGGCCAGCACCTGCAGAGCGGCGTGCCCAGCCGGTTTAGCGGCAGC GGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGAC TTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCGCCTACCCACCTTCGGCCAG GGCACCAAGCTTGAAATCAAAGGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGC CTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGAC TACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC TCGCCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

61

CDRH1, NV163-1	15: SYGIS
CDRH2, NV163-1	16: WVNTNTGNPRYAQGFTG
CDRH3, NV163-1	17: EGFIRTVVGAAGRFVY
CDRL1, NV163-1	18: RASQDIHTRLA
CDRL2, NV163-1	19: WASTRGS
CDRL3, NV163-1	20: QQYSAYPT
VH, NV163-1	21: QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWV NTNTGNPRYAQGFTGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAREGFI RTVVGAAGRFVYWGQGLTVSS
VL, NV163-1	22: DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIHTRLAWYQQKPGKAPKLLIYWA STRGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSAYPTFGQGTK LEIK
PN encoding SEQ.I.D.NO:21	23: CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCA GTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATC AGTTGGGTGCGACAGGCCCGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGGTC AACACCAACACTGGGAACCCAAGGTACGCCAGGGCTTCACGGGACGGTTT GTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTCAGTACGGCATATCTGCAGATCAGCAGC CTAAAGGCTGAGGACACTGCCGTGTACTACTGCGCAAGAGAAGGCTTTATT CGTACGGTAGTGGGTGCCGCCGGTCGTTTTGTGTATTGGGGCCAAGGTACC CTGGTGACCGTGAGCTCC
PN encoding SEQ.I.D.NO:22	24: GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGAC AGAGTCACCATCACTTGTCTGGGCCAGTCAGGATATTCATACTCGGTGGCT TGGTACCAGCAGAAACCAGGAAAAGCCCCCTAAGCTGCTCATTTACTGGGCA TCTACCCGTGGATCCGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGAAGTGGATCTGGG ACAGATTTTACTTTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACC TACTACTGCCAGCAGTATAGCGCATATCCGACGTTTGGCCAAGGTACGAAA CTGGAAATTAAA



CLAIMS

1. An isolated antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region sequence of SEQ ID NO: 7 or SEQ.I.D.NO:21.
2. An isolated antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region sequence of SEQ ID NO: 7 and a light chain variable region sequence of SEQ ID NO: 8 or a heavy chain variable region sequence of SEQ ID NO: 21 and a light chain variable region sequence of SEQ ID NO: 22.
3. The antibody of claim 2 which comprises CDRH1,H2 and H3 of SEQ.I.D.NO:1,2 and 3 respectively or SEQ.I.D.NO:15,16 and 17 respectively or a CDRL1, L2 and L3 sequence of SEQ.I.D.NO:4,5 and 6 respectively or SEQ.I.D.NO:18,19 and 20 respectively.
4. The antibody of claim 2 which comprises CDRH1,H2 and H3 of SEQ.I.D.NO:1,2 and 3 respectively or SEQ.I.D.NO:15,16 and 17 respectively and a CDRL1, L2 and L3 sequence of SEQ.I.D.NO:4,5 and 6 respectively or SEQ.I.D.NO:18,19 and 20 respectively.
5. The antibody of claim 2 which comprises a heavy chain variable region amino acid sequence that is at least 80% identical to SEQ ID NO: 7 and a light chain variable region amino acid sequence that is at least 80% identical to SEQ ID NO: 8 or which comprises a heavy chain variable region amino acid sequence that is at least 80% identical to SEQ ID NO: 21 and a light chain variable region amino acid sequence that is at least 80% identical to SEQ ID NO: 22.
6. The antibody of claim 2 which is a chimeric antibody.
7. The antibody of claim 1 or 2 which comprises a human heavy chain constant region and a human light chain constant region.
8. The antibody of claim 2 which is a humanized antibody.
9. The antibody of claim 2 which is a human antibody.
10. The antibody of claim 2 which is a single chain antibody.
11. The antibody of claim 2 which is a Fab fragment.



12. The antibody of claim 2 which is of the IgG1 or IgG4 isotype.
13. An isolated antibody comprising a heavy chain of SEQ.I.D.NO:9 and a light chain of SEQ.I.D.NO:10.
14. An isolated or recombinant polynucleotide which encodes a polypeptide comprising the variable region of the heavy chain or the variable region of the light chain of the antibody of any one of claims 2 to 13.
15. The polynucleotide of claim 14 wherein the antibody is a human antibody.
16. The polynucleotide of claim 14 wherein the polynucleotide encoding the heavy chain variable region is SEQ.I.D.NO:11 and the polynucleotide encoding the light chain variable region is SEQ.I.D.NO:12.
17. An isolated host cell comprising (1) a recombinant DNA segment encoding a heavy chain of the antibody of any one of claims 2 to 13 and (2) a second recombinant DNA segment encoding a light chain of the antibody of any one of claims 2 to 13; wherein said DNA segments are respectively operably linked to a first and a second promoter, and are capable of being expressed in said host cell.
18. The isolated host cell of claim 17 wherein the cell is a CHO or NSO cell line.
19. A method of treating an inflammatory disease or disorder in a subject, the method comprising administering to the subject a pharmaceutical composition comprising an effective amount of an antibody of any one of claims 2 to 13.
20. The method of claim 19 wherein the subject is a human.
21. The method of claim 19 or 20 wherein the subject suffers from an allergic inflammatory disease.
22. The method of claim 21, wherein the allergic inflammatory disease is atopic dermatitis, asthma, or allergic rhinitis.

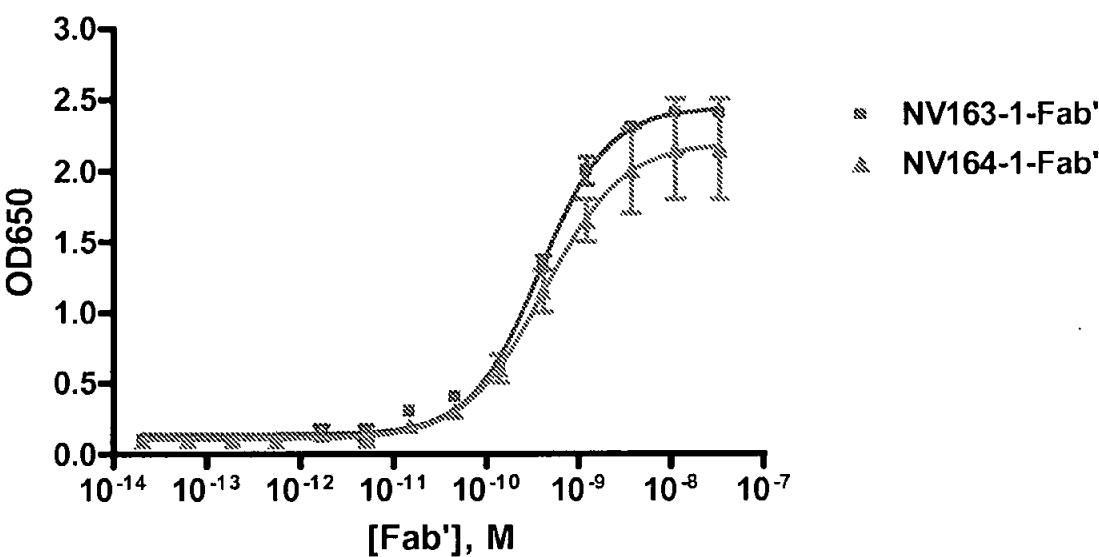
69

23. A pharmaceutical composition comprising the antibody of any one of claims 1 to 13 together with a pharmaceutically acceptable carrier or excipient, particularly for use in the method of any one of claims 19 to 22.

24. The composition of claim 23 suitable for subcutaneous or intravenous administration.

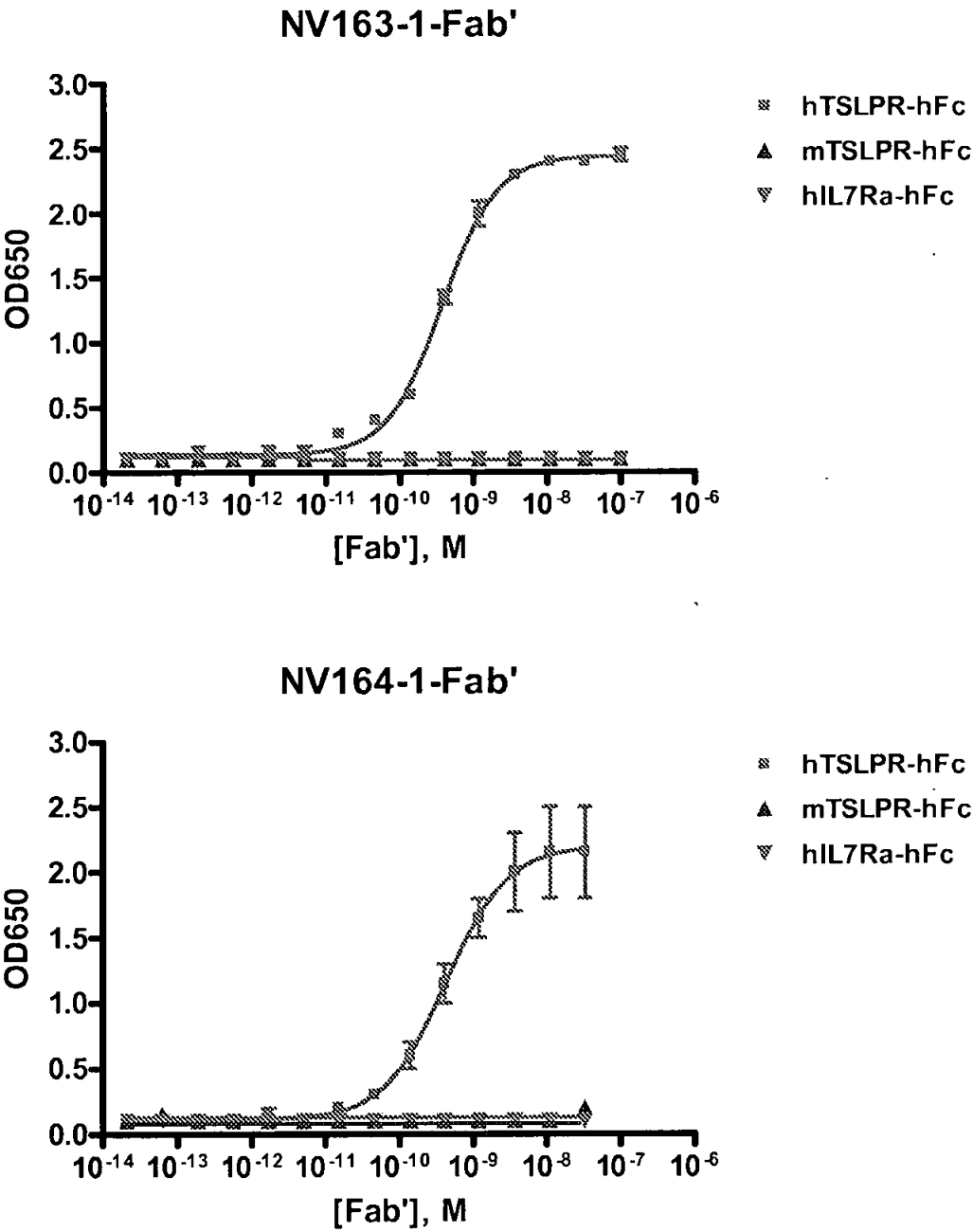


Figure 1



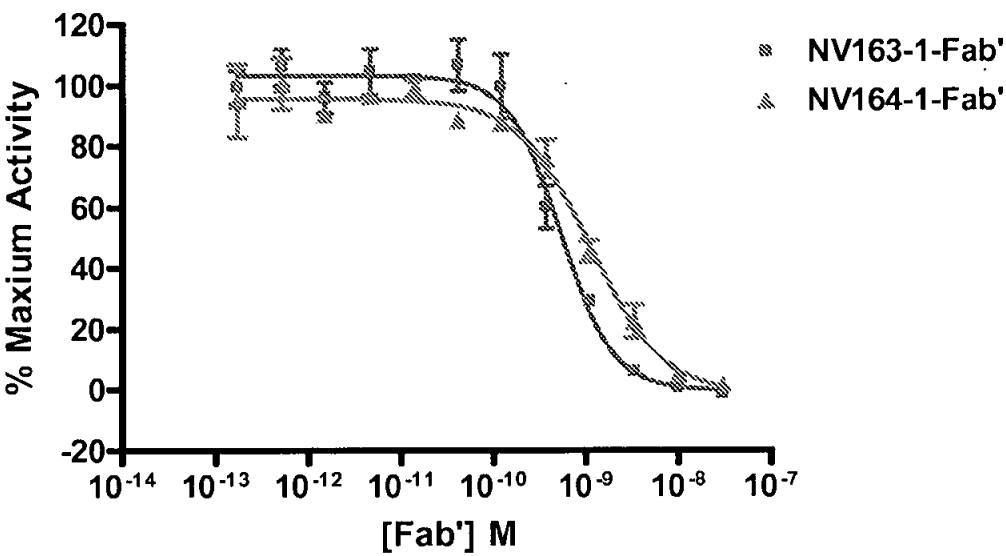
16

Figure 2



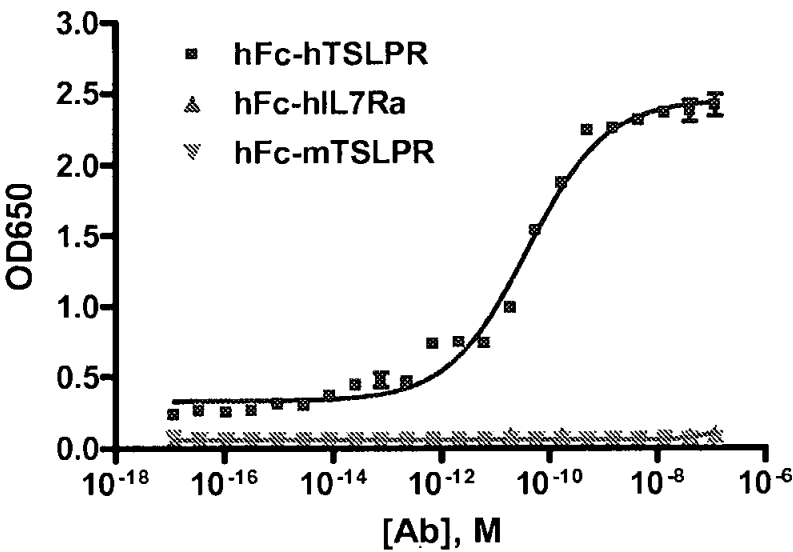
3/12

Figure 3



66

Figure 4



69

Figure 5

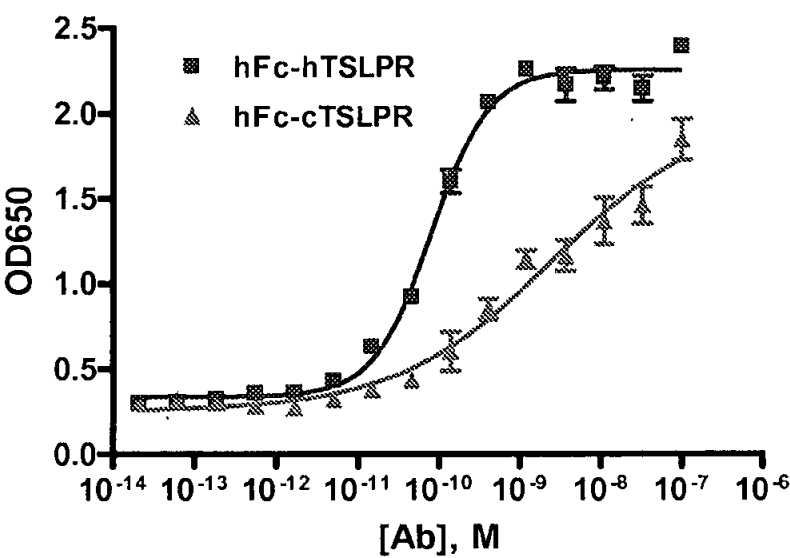
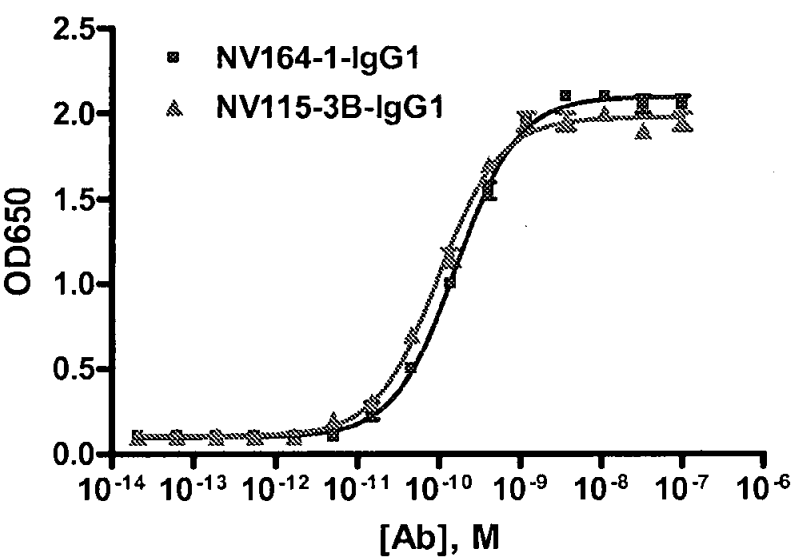
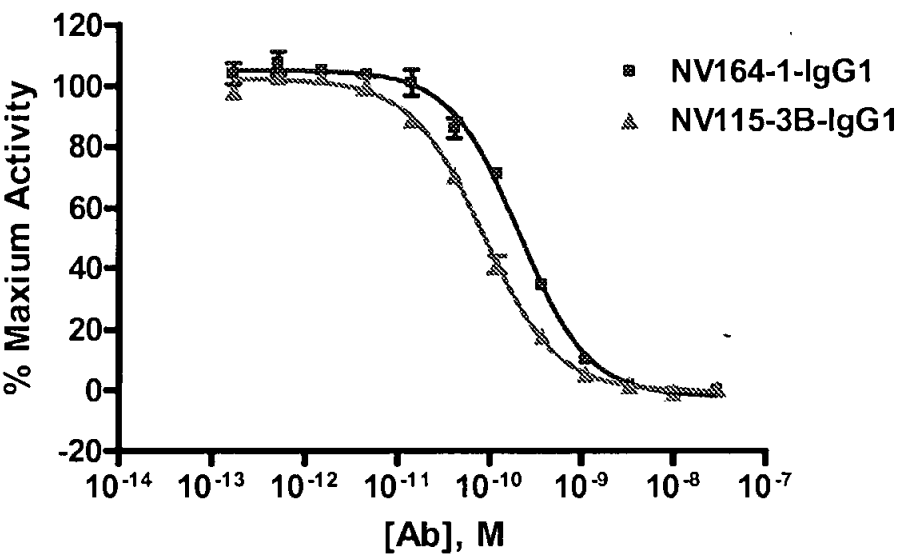


Figure 6



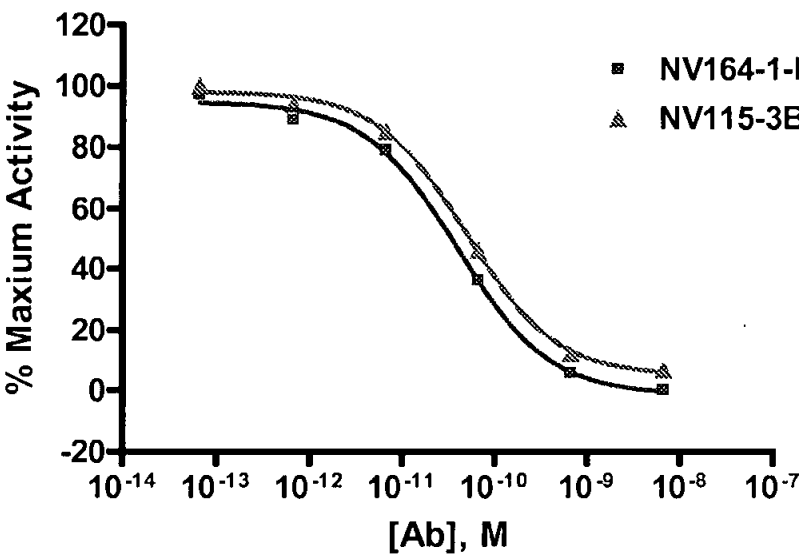
Handwritten signature

Figure 7



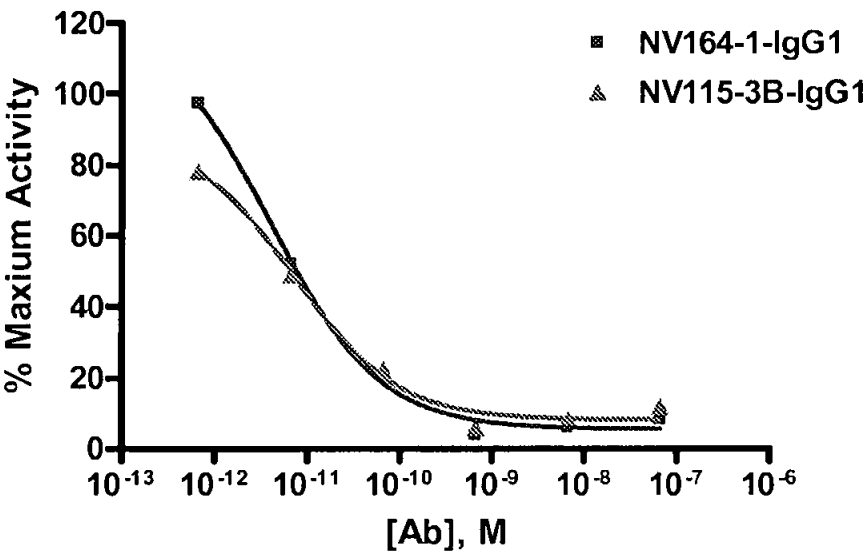
8/12

Figure 8



9/12

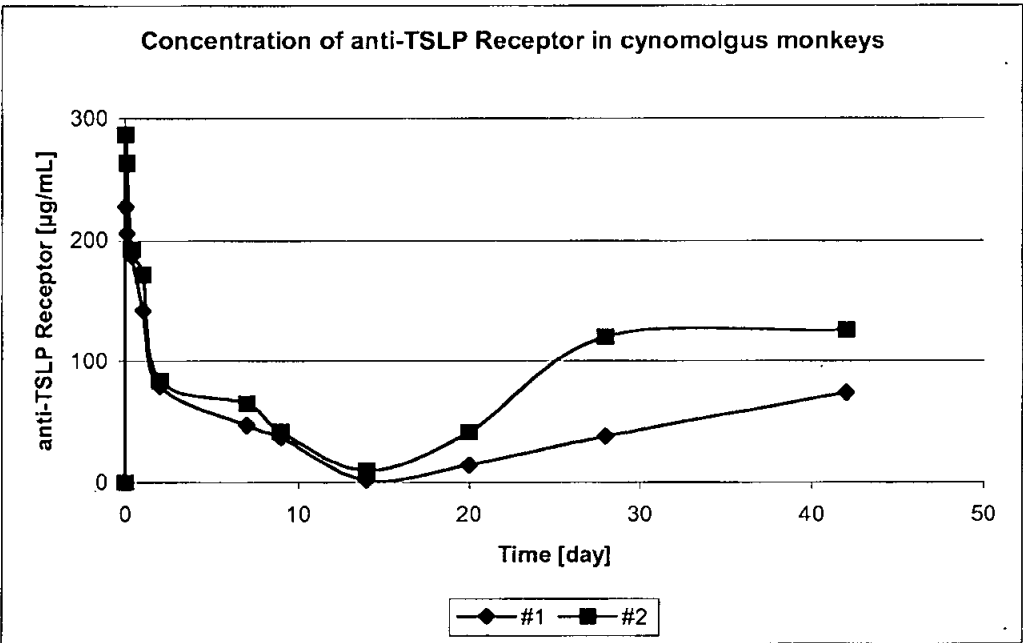
Figure 9



10/12

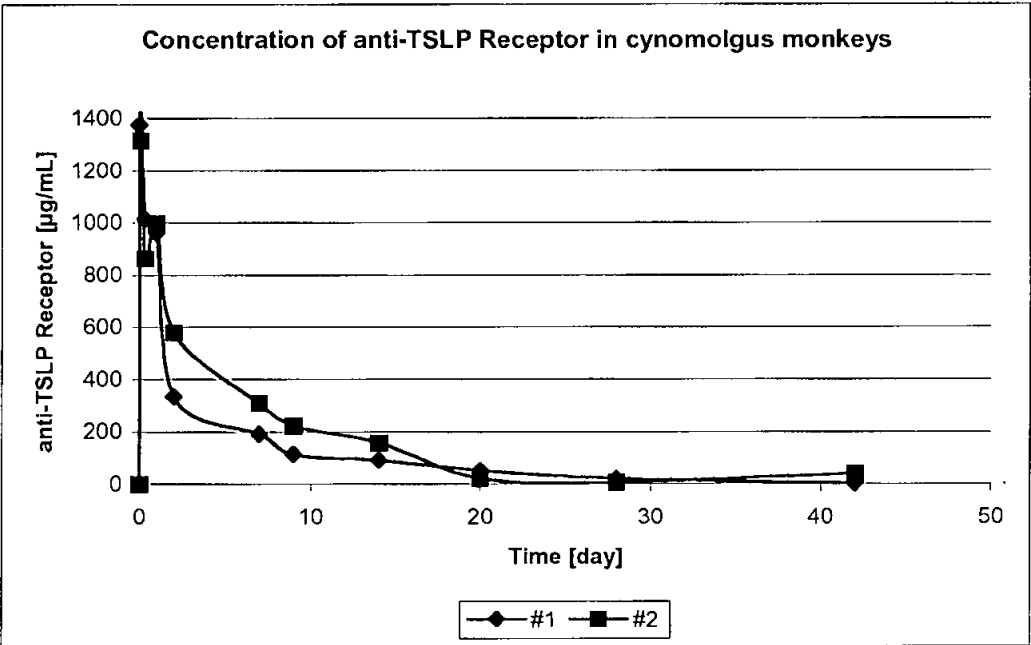
Figure 10

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



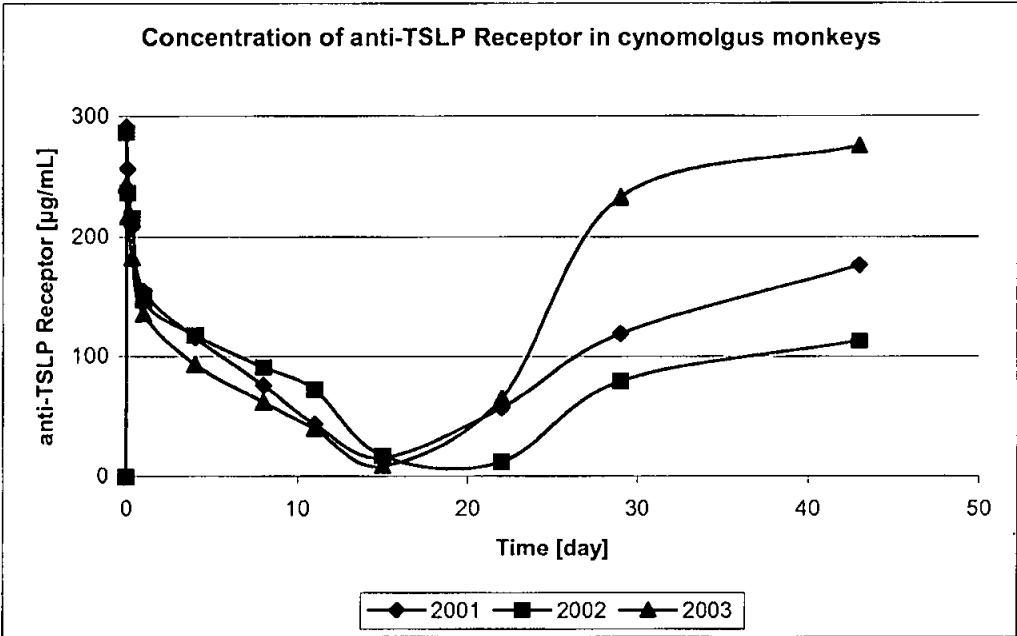
11/12

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



12/12

C. NV115-3B-IgG1, 10 mg/kg



**(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA DE ACUERDO CON EL
TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (TCP)
OMPI**

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de la Publicación Internacional
24 de Diciembre de 2008 (24.12.2008)

(10) Número de la Publicación Internacional
PCT
WO 2008/155365 A1

(51) Clasificación Internacional de Patente:
C07K 16/28 (2006.01)

(21) Número de Solicitud Internacional:
PCT/EP2008/057731

(22) Fecha de Presentación Internacional:
18 de Junio de 2008 (18.06.2008)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:
60/945,205 20 de Junio de 2007 (20.06.2007) US

(71) Solicitante (para todos los Estados (Países) designados excepto US) : IRM LLC [US/US]; Hurst Holme, 12 Trott Road, Hamilton, HM 11 (BM).

(71) Solicitante (para TT solamente) : NOVARTIS AG [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basilea (CH).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente) : DONG, Liquan [CN/US]; 5075 Sterling Grove Lane, San Diego, California 92130 (US). NASOFF, Marc [US/US]; 11734 Mira Lago Way, San Diego, California 92131 (US).

(74) Agente : NASH, Guy; Novartis Pharma AG, Departamento de Patentes, CH-4002 Basilea (CH).

(81) Estados (Países) Designados (a menos que se indique otra cosa, para cada tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados (Países) Designados (a menos que se indique otra cosa, para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiáticos (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europeos (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaración de acuerdo con la Regla 4.17:

-- con respecto al derecho de la solicitante de solicitar y otorgársele una patente (Regla 4.17(ii))

Publicada:

-- con reporte de búsqueda internacional
-- antes del vencimiento del límite de tiempo para enmendar las reivindicaciones, y para volverse a publicar en el caso de recibirse las enmiendas

**(54) Título: MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES
 ALÉRGICAS**

(57) Resumen: En la presente invención se dan a conocer anticuerpos que reconocen específicamente y antagonizan al receptor de TSLP humano, y métodos para emplear estos anticuerpos con el fin de tratar o aminorar las enfermedades o trastornos mediados por la señalización de TSLP.

WO 2008/155365 A1

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES ALÉRGICAS

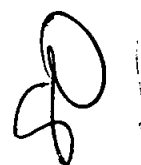
ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 Las citoquinas y las células inmunes median los
mecanismos o sendas fisiológicas específicas, por ejemplo, las
sendas que conducen a los diferentes trastornos inflamatorios. La
linfopoiatina estromal tímica humana (TSLP) es una citoquina tipo
IL-7 que se produce a partir de las células epiteliales humanas. Ésta
10 promueve la diferenciación de las células-B, y también puede co-
estimular tanto los timocitos como las células-T maduras. La
linfopoiatina estromal tímica humana se enlaza con un receptor
heterodimérico específico sobre las células dendríticas CD11c+
(DCs). El heterodímero receptor consiste en una cadena receptora
15 tipo gamma (receptor de TSLP; TSLPR), y en la cadena de IL-7R- α .
Véase, por ejemplo, Tonozyuka y colaboradores, *Cytogenet. Cell*
Genet. 93:23-25, 2001; Pandey y colaboradores, *Nat. Immunol.*
1:59-64, 2000; L. S. Park y colaboradores, *J. Exp. Med.* 192:659-
670, 2000; y Reche y colaboradores, *J. Immunol.* 167:336-343,
20 2001. El enlace de ligando con el receptor induce a las células
dendríticas a secretar las quimiocinas atrayentes de T_H2, la TARC
(quimiocina regulada por el timo y por la activación), y MDC
(quimiocina derivada de macrófagos). En adición, la linfopoiatina
estromal tímica humana también induce una potente activación de
25 las células dendríticas, una expansión de células-T CD4+ puras, y la

subsiguiente polarización hasta un fenotipo de T_H2 , produciendo las citoquinas pro-alérgicas de interleucina 4 (IL-4), IL-5, IL-13, y el factor de necrosis tumoral- α .

También se encontró que la señalización de TSLP da como resultado la activación del factor de transcripción Stat5. Adicionalmente, se ha reportado que los pacientes de dermatitis atópica tanto aguda como crónica sobre-expresan la TSLP en lesiones de la piel, sugiriendo que la expresión de TSLP está asociada con la inflamación alérgica *in vivo*. Aparte de los queratinocitos de la piel, también se ha encontrado un alto nivel de expresión de TSLP en las células epiteliales bronquiales, en los músculos lisos, y en los fibroblastos pulmonares, apoyando una función potencial para la TSLP en las indicaciones alérgicas respiratorias también. Más aún, los mastocitos activados por IgE expresan un nivel muy alto de TSLP, un mecanismo que podría participar en el mantenimiento del fenotipo T_H2 .

Aproximadamente el 20 por ciento de la población de los países occidentales sufre de trastornos inflamatorios, por ejemplo las enfermedades alérgicas, las cuales incluyen asma, rinitis, dermatitis atópica, y alergia a los alimentos. Del 50 por ciento al 80 por ciento de los pacientes con dermatitis atópica tienen o desarrollan asma o rinitis alérgica. Hasta la fecha, no existe una cura para el asma inducido por alergia, dermatitis atópica, y rinitis alérgica. Los tratamientos actuales, tales como los antagonistas del adrenoceptor beta-2 para asma, Elidel para dermatitis atópica, y la



antihistamina-H1 para la rinitis alérgica, se utilizan para dirigirse a los síntomas. Por consiguiente, existe una mayor necesidad en la técnica de mejores terapias para tratar estos trastornos inflamatorios, en particular la inflamación alérgica. La presente invención resuelve éste y otros problemas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Una modalidad de la invención en la presente proporciona un anticuerpo humano o humanizado aislado, o un fragmento funcional del mismo, con una región de enlace de antígeno que es específica para el receptor de linfopoiatina estromal tímica humana de la proteína objetivo (hTSLPR) y el anticuerpo o el fragmento funcional del mismo se enlaza con hTSLPR). En una modalidad relacionada, el enlace con hTSLPR se determina cuando menos por el enlace del receptor de hTSLP de superficie celular que impide la liberación del mediador inflamatorio.

En todavía otra modalidad, la invención proporciona una región de enlace de antígeno aislada de un anticuerpo o fragmento funcional del mismo. En ciertas modalidades, la región de enlace de antígeno aislada incluye una región CDRH1 que tiene una secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 1, y variantes conservadoras de la misma. Como se describe en la presente, las variantes conservadoras incluyen los residuos de aminoácidos en cualquiera de las secuencias de aminoácidos identificadas. En una modalidad relacionada, la región de enlace de antígeno aislada es una región CDRH2 que tiene una secuencia de aminoácidos

estipulada en la SEQ ID NO: 2, y variantes conservadoras de la misma. En otra modalidad relacionada, la región de enlace de antígeno aislada es una región CDRH3 que tiene una secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 2, y las variantes conservadoras de la misma. En otra modalidad relacionada, la región de enlace de antígeno aislada es una región CDRH3 que tiene una secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 3, y las variantes conservadoras de la misma.

En otra modalidad, la región de enlace de antígeno aislada es una región CDRL1 que tiene una secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 4, y las variantes conservadoras de la misma. En todavía otra modalidad relacionada, la región de enlace de antígeno aislada es una región CDRL2 que tiene una secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 5, y las variantes conservadoras de la misma. En todavía otra modalidad relacionada, la región de enlace de antígeno aislada es una región de CDRL3 que tiene una secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 6, y las variantes conservadoras de la misma.

En otra modalidad, la región de enlace de antígeno aislada es una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de región variable estipulada en la SEQ ID NO: 7, y una secuencia que tiene una identidad de secuencia de cuando menos el 60, 70, 80, 90, ó 95 por ciento en las regiones de CDR, con la región de CDR de la SEQ ID NO: 7. En una modalidad relacionada, la región de enlace de antígeno aislada es una cadena ligera que tiene la

secuencia de aminoácidos de la región variable estipulada en la SEQ ID NO: 8, y una secuencia que tiene una identidad de secuencia de cuando menos el 60, el 70, el 80, el 90, o el 95 por ciento en las regiones de CDR, con la región de CDR de la SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto, la presente invención proporciona compuestos antagonistas monoclonales contra hTSLPR. Algunos de los anticuerpos anti-TSLPR de la invención tienen la misma especificidad de enlace que aquélla de un anticuerpo de referencia que contiene una secuencia de región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 7, y una secuencia de región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 8. Algunos de estos anticuerpos son anticuerpos completamente humanos que exhiben la misma especificidad de enlace que aquélla del anticuerpo de referencia. Algunos de los anticuerpos tienen una secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) de cadena pesada de la SEQ ID NOs: 1, 2, ó 3, y/o una secuencia de la región determinante de complementariedad (CDR) de cadena ligera de la SEQ ID NO: 4, 5, ó 6.

Algunos de los anticuerpos anti-hTSLPR tienen las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena pesada, las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, y SEQ ID NO: 3, respectivamente; y las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena ligera, las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 6, respectivamente. Algunos otros anticuerpos de la invención contienen una secuencia de



aminoácidos de la región variable de cadena pesada que es cuando menos el 85 por ciento idéntica a la SEQ ID NO: 7, y una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera que es cuando menos el 85 por ciento idéntica a la SEQ ID NO: 8. Algunos otros anticuerpos anti-hTSLPR de la invención tienen una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que es idéntica a la SEQ ID NO: 7, y una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera que es idéntica a la SEQ ID NO: 8, con una región constante de IgG humana (por ejemplo, una IgG1 ó IgG4).

Algunos anticuerpos anti-hTSLPR de la invención son anticuerpos de ratón. Algunos otros son anticuerpos quiméricos. Algunos de los anticuerpos quiméricos tienen una región constante de cadena pesada humana, y una región constante de cadena ligera humana. Algunos otros anticuerpos anti-hTSLPR de la invención son anticuerpos humanizados. Algunos otros anticuerpos anti-hTSLPR de la invención son anticuerpos completamente humanos que exhiben la misma especificidad de enlace que un anticuerpo que contiene una secuencia de la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 7, y una secuencia de la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 8. En la invención también se proporcionan anticuerpos de una sola cadena, por ejemplo un fragmento Fab. Algunos de los anticuerpos anti-hTSLPR son del isotipo IgG1. Algunos otros anticuerpos son del isotipo IgG4.

En otro aspecto, la invención proporciona polinucleótidos

aislados o recombinantes (por ejemplo, ADN) que codifican un polipéptido que contiene la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-hTSLPR de la invención. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden codificar una

5 cadena pesada de anticuerpo que contiene las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena pesada como se estipula anteriormente, respectivamente. Los polinucleótidos también pueden codificar una cadena ligera de anticuerpo que contiene las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 como se estipula en lo anterior, respectivamente.

10 Algunos polinucleótidos de la invención codifican una secuencia de la región variable de cadena ligera madura que es cuando menos el 90 por ciento idéntica a la región madura de la SEQ ID NO: 7. Algunos otros polinucleótidos codifican una secuencia de la región variable de cadena ligera madura que es cuando menos el 90 por

15 ciento idéntica a la región madura de la SEQ ID NO: 8. Algunos de estos polinucleótidos codifican una secuencia de la región variable de cadena pesada madura que es idéntica a la región madura de la SEQ ID NO: 7, o una secuencia de la región variable de cadena ligera madura que es idéntica a la región madura de la SEQ ID NO:

20 8. Las secuencias de ejemplo de los polinucleótidos que codifican las cadenas pesada y ligera de la invención incluyen las SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente.

En otro aspecto, la invención proporciona células huésped aisladas que alojan (1) un segmento de ADN recombinante que

25 codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-hTSLPR de la



invención, y (2) un segundo segmento de ADN recombinante que codifica una cadena ligera del anticuerpo. En algunas de las células huésped, los segmentos de ADN recombinante respectivamente se enlazan operativamente con un primero y un segundo promotor, y son capaces de ser expresados en las células huésped. Algunas de estas células huésped expresan un anticuerpo monoclonal que tiene las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena pesada (por ejemplo, SEQ ID NOs: 1, 2, y 3), respectivamente; y las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena ligera (por ejemplo, SEQ ID NOs: 4, 5, y 6), respectivamente. Algunas otras células huésped expresan un anticuerpo anti-hTSLPR que contiene una secuencia de la región variable de cadena pesada madura que es cuando menos el 90 por ciento idéntica a la región madura de la SEQ ID NO: 7; y una secuencia de la región variable de cadena ligera madura que es cuando menos el 90 por ciento idéntica a la región madura de la SEQ ID NO: 8. Algunas de estas células huésped expresan un anticuerpo anti-hTSLPR que contiene una secuencia de la región variable de cadena pesada madura que es idéntica a la región madura de la SEQ ID NO: 7, y una secuencia de la región variable de cadena ligera madura que es idéntica a la región madura de la SEQ ID NO: 8. Algunas de las células huésped son células de mamífero no humanas (por ejemplo, CHO, NS0, SP2/0).

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno inflamatorio en un sujeto, por ejemplo en un paciente humano. Estos métodos implican

administrar al sujeto una composición farmacéutica que contiene una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-hTSLPR. Típicamente, un anticuerpo anti-hTSLPR tiene la misma especificidad de enlace que aquélla de un anticuerpo anti-hTSLPR que contiene una

5 secuencia de la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 7, y una secuencia de la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 8. En algunos de estos métodos terapéuticos, se emplea un anticuerpo completamente humano. En algunos métodos, el anticuerpo anti-TSLPR aloja a las secuencias de CDR1, CDR2, y

10 CDR3 de cadena pesada, las SEQ ID NOs: 1, 2, y 3, respectivamente; y las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena ligera de las SEQ ID NOs: 4, 5, y 6, respectivamente. En algunos métodos, el anticuerpo anti-hTSLPR empleado contiene una secuencia de la región variable de cadena pesada madura que es

15 idéntica a la región madura de la SEQ ID NO: 7, y una secuencia de la región variable de cadena ligera madura que es idéntica a la región madura de la SEQ ID NO: 8. Algunos de los métodos se dirigen al tratamiento de sujetos que sufran de una enfermedad inflamatoria alérgica. Los ejemplos de las enfermedades

20 inflamatorias alérgicas que son susceptibles al tratamiento incluyen dermatitis atópica, asma, o rinitis alérgica.

En todavía otra modalidad, la invención proporciona una región de enlace de antígeno aislada de un anticuerpo o fragmento funcional del mismo. En ciertas modalidades, la región de enlace de

25 antígeno aislada incluye una región CDRH1 que tiene una secuencia

de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 1, o las variantes conservadoras de la misma. Como se describen en la presente, las variantes conservadoras incluyen los residuos de aminoácidos en cualquiera de las secuencias de aminoácidos identificadas. En una
5 modalidad relacionada, la región de enlace de antígeno aislada es una región CDRH2 que tiene una secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 2, o las variantes conservadoras de la misma. En otra modalidad relacionada, la región de enlace de antígeno aislada es una región CDRH3 que tiene una secuencia de
10 aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 3, o las variantes conservadoras de la misma.

En otra modalidad, la región de enlace de antígeno aislada es una región CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 4, o las variantes conservadoras de la
15 misma. En todavía otra modalidad relacionada, la región de enlace de antígeno aislada es una región CDRL2 que tiene una secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 5, o las variantes conservadoras de la misma. En todavía otra modalidad relacionada, la región de enlace de antígeno aislada es una región CDR3 que
20 tiene una secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO: 6, o las variantes conservadoras de la misma.

En otra modalidad, la región de enlace de antígeno aislada es una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable estipulada en la SEQ ID NO: 7, y una secuencia que
25 tiene una identidad de secuencia de cuando menos el 60, el 70, el

80, el 90, o el 95 por ciento en las regiones CDR, con la región CDR de la SEQ ID NO: 7. En una modalidad relacionada, la región de enlace de antígeno aislada es una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable estipulada en la
5 SEQ ID NO: 8, y una secuencia que tiene una identidad de secuencia de cuando menos el 60, el 70, el 80, el 90, o el 95 por ciento en las regiones CDR, con la región CDR de la SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos antagonistas monoclonales contra hTSLPR. Algunos de
10 los anticuerpos anti-hTSLPR de la invención tienen la misma especificidad de enlace que aquélla de un anticuerpo de referencia que contiene una secuencia de la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 7, y una secuencia de la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 8. Algunos de estos anticuerpos son
15 anticuerpos completamente humanos que exhiben la misma especificidad de enlace que aquélla del anticuerpo de referencia.

En otro aspecto, la invención proporciona polinucleótidos aislados o recombinantes (por ejemplo, ADN) que codifican un polipéptido que contiene la región variable de cadena pesada o la
20 región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-hTSLPR de la invención. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden codificar una cadena pesada de anticuerpo que contenga las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena pesada estipuladas anteriormente, respectivamente. Los polinucleótidos también pueden codificar una
25 cadena ligera de anticuerpo que contenga las secuencias de CDR1,



CDR2, y CDR3 estipuladas anteriormente, respectivamente. Algunos polinucleótidos de la invención codifican una secuencia de la región variable de cadena pesada madura que es cuando menos el 90 por ciento idéntica a la región madura de la SEQ ID NO: 7. Algunos
5 otros polinucleótidos codifican una secuencia de la región variable de cadena ligera madura que es cuando menos el 90 por ciento idéntica a la región madura de la SEQ ID NO: 8. Algunos de estos polinucleótidos codifican una secuencia de la región variable de cadena pesada madura que es idéntica a la región madura de la
10 SEQ ID NO: 7, o una secuencia de la región variable de cadena ligera madura que es idéntica a la región madura de la SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto, la invención proporciona células huésped aisladas que alojan (1) un segmento de ADN recombinante que
15 codifica una cadena pesada de un anticuerpo anti-hTSLPR de la invención, y (2) un segundo segmento de ADN recombinante que codifica una cadena ligera del anticuerpo. En algunas de las células huésped, los segmentos de ADN recombinante respectivamente se enlazan operativamente con un primero y un segundo promotor, y
20 pueden ser expresados en las células huésped. Algunas de estas células huésped expresan un anticuerpo monoclonal que tiene las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena pesada (por ejemplo, SEQ ID NOs: 1, 2, y 3), respectivamente; y las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena ligera (por ejemplo, SEQ ID
25 NOs: 4, 5, y 6, respectivamente). Algunas otras células huésped



expresan un anticuerpo anti-hTSLPR que contiene una secuencia de la región variable de cadena pesada madura que es cuando menos el 90 por ciento idéntica a la región madura de la SEQ ID NO: 7; y una secuencia de la región variable de cadena ligera madura que es cuando menos el 90 por ciento idéntica a la región madura de la SEQ ID NO: 8. Algunas de estas células huésped expresan un anticuerpo anti-hTSLPR que contiene una secuencia de la región variable de cadena pesada madura que es idéntica a la región madura de la SEQ ID NO: 7, y una secuencia de la región variable de cadena ligera madura que es idéntica a la región madura de la SEQ ID NO: 8. Algunas de las células huésped son células de mamífero no humano (por ejemplo, CHO, NS0, SP2/0).

En otro aspecto, la invención proporciona métodos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno inflamatorio en un sujeto, por ejemplo un paciente humano. Estos métodos implican administrar al sujeto una composición farmacéutica que contiene una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-hTSLPR. Típicamente, el anticuerpo anti-hTSLPR tiene la misma especificidad de enlace que aquélla de un anticuerpo anti-hTSLPR que contiene una secuencia de la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 7, y una secuencia de la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 8, y/o un anticuerpo aislado que comprende una cadena pesada de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 10. En algunos de estos métodos terapéuticos, se emplea un anticuerpo completamente humano. Algunos de los métodos se

dirigen al tratamiento de sujetos que sufran de una enfermedad inflamatoria alérgica. Los ejemplos de las enfermedades inflamatorias alérgicas que son susceptibles al tratamiento incluyen dermatitis atópica, asma, o rinitis alérgica.

5 En otros aspectos de la invención, se proporciona un anticuerpo anti-HTSLPR aislado que comprende (o que consiste en) una cadena pesada de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 10. La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo que comprende (o que
10 consiste en) una cadena pesada de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 10, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, como se conoce y se refiere en la práctica farmacéutica aceptada.

En todavía otra modalidad, la invención proporciona un
15 inmunconjugado hecho de un primer componente que es un anticuerpo o fragmento del mismo, y un segundo componente que tiene una segunda secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, el inmunconjugado es una citotoxina, o el inmunconjugado es una proteína de enlace o un anticuerpo que tiene una especificidad de
20 enlace por un objetivo que es diferente de la HTSLPR.

En otra modalidad, la invención proporciona un kit que tiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo de la invención, como se describe anteriormente (por ejemplo, el anticuerpo de las SEQ ID NOs: 9 y 10). En algunas modalidades, el
25 kit contiene además un vehículo o excipiente farmacéuticamente

aceptable para el mismo. En otras modalidades relacionadas, el anticuerpo en el kit está presente en una dosis unitaria. En todavía otra modalidad relacionada, el kit incluye instrucciones para utilizarse en la administración a un sujeto.

- 5 Un entendimiento adicional de la naturaleza y ventajas de la presente invención se puede hacer mediante la referencia a las fracciones restantes de la descripción y de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Enlace de NV163-1 Fab' y NV164-1-Fab' con el TSLPR humano en ELISA. Una placa ELISA se recubrió con el hTSLPR. La placa se incubó en secuencia con el Fab' anti-hTSLPR, IgG de cabra anti-humana conjugada con HRP, anticuerpo específico F(ab')₂, y sustrato de TMB. Los NV163-1-Fab' y NV164-1-Fab' se utilizaron en el intervalo de concentraciones de 2.1×10^{-14} a 3.3×10^{-8} M, como se indica. NV-164-1 comprende la región variable de las SEQ ID NOs: 7 y 8. NV164-1-IgG1 consiste en una cadena pesada de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 10, y NV164-1 es una modalidad de la invención. NV161-1 comprende la región variable de la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 22.

Figura 2. Especificidad de enlace de NV163-1-Fab' y NV164-1-Fab' con TSLPR humano, TSLPR de ratón, e IL-7R α humano en ELISA. Una placa ELISA se recubrió con hTSLPR, mTSLPR, o hIL7R α . La placa se incubó con el Fab' anti-hTSLPR, seguido por la IgG de cabra anti-humana conjugada con HRP, el

anticuerpo específico $F(ab')_2$, y el sustrato de TMB. NV163-1-Fab' y NV164-1-Fab' se utilizaron en el intervalo de concentraciones de 2.1×10^{-14} a 3.3×10^{-8} M, como se indica.

Figura 3. Actividad antagonista de NV163-1-Fab' y NV164-1-Fab' en el Ensayo de Gen Reportero de Luciferasa. Las células Ba/F3 que sobre-expresaban establemente hTSLPR/hIL7R α /Stat5-Luc, se incubaron previamente con el Fab', y luego se estimularon con 1 nanogramo/mililitro de la TSLP humana. Después de 6 horas de incubación, se midió la actividad de luciferasa utilizando Bright Glo. Los NV163-1-Fab y NV164-1-Fab' se utilizaron en el intervalo de concentraciones de 1.7×10^{-13} a 3.0×10^{-8} M, como se indica. Esta figura es representativa de un número de experimentos individuales. La IC_{50} es de 2.7 ± 1.9 nM para NV163-1-Fab' y de 4.0 ± 2.1 nM para NV164-1-Fab' (n = 4).

Figura 4. Especificidad de enlace de NVP164-1-IgG1 con el TSLPR humano, el TSLPR de ratón, y el IL7R α humano en ELISA. Una placa ELISA se recubrió con hTSLPR, mTSLPR ó hIL7R α . La placa se incubó con anti-hTSLPR, NVP-164-IgG1, seguido por IgG de cabra anti-humana conjugada con HRP, el anticuerpo específico $F(ab')_2$, y el sustrato de TMB. NVP164-1-IgG1 se utilizó en el intervalo de concentraciones de 1.2×10^{-17} a 1.2×10^{-7} M, como se indica.

Figura 5. Reactividad cruzada de NVP164-1-IgG1 con el TSLPR humano y de cinomolgo en ELISA. Una placa ELISA se recubrió con hTSLPR, o con cTSLPR. La placa se incubó con anti-

hTSLPR, NVP164-1-IgG1, seguido por IgG de cabra anti-humana, conjugada con HRP, el anticuerpo específico F(ab')₂, y el sustrato de TMB. NVP164-1-IgG1 se utilizó en el intervalo de concentraciones de 2.1×10^{-14} a 1.0×10^{-7} M, como se indica.

5 Figura 6. Enlace de NV164-1-IgG1 y NV115-3B-IgG1 con el TSLPR humano en ELISA. Una placa ELISA se recubrió con hTSLPR. La placa se incubó con NV164-1-IgG1 ó NV115-3B-IgG1, seguido por IgG de cabra anti-humana conjugada con HRP, el anticuerpo específico F(ab')₂, y el sustrato de TMB. NV164-1-IgG1
10 y NV115-3B-IgG1 se utilizaron en el intervalo de concentraciones de 2.1×10^{-14} a 1.0×10^{-7} M, como se indica.

 Figura 7. Actividad antagonista de NV164-1-IgG1 y NV115-3B-IgG1 en el Ensayo de Gen Reportero de Luciferasa. Las células Ba/F3 que sobre-expresaban establemente hTSLPR/hIL7R α /Stat5-Luc, se incubaron previamente con el anticuerpo, y luego se estimularon con 1 nanogramo/mililitro de TSLP humana recombinante. Después de 6 horas de incubación, se midió la actividad de luciferasa utilizando Bright-Glo (Promega). Los anticuerpos se utilizaron en el intervalo de concentraciones de 1.7×10^{-13} a 3.0×10^{-8} M, como se indica. La gráfica es de uno de los
15 experimentos individuales representativos. La IC₅₀ es de 221 ± 101 pM para NV164-1-IgG1 (n = 8), y de 126 ± 72 pM para NV115-3B-IgG1 (n = 6).
20

 Figura 8. Actividad antagonista de NV164-1-IgG1 y NV115-3B-IgG1 contra la TSLP de fuente natural en el Ensayo de
25

Gen Reportero de Luciferasa. Las células Ba/F3 que sobre-
expresaban establemente hTSLPR/hIL7Ra/Stat5-Luc, se incubaron
previamente con el anticuerpo, y luego se estimularon con 1
nanogramo/mililitro de TSLP natural humano. Después de 6 horas
de incubación, se midió la actividad de luciferasa utilizando Bright-
Glo. Los anticuerpos se utilizaron en el intervalo de concentraciones
de 6.7×10^{-14} a 6.7×10^{-9} M, como se indica. La IC_{50} es de 40 ± 10
pM para NV164-1-IgG1, y de 50 ± 25 pM para NV115-3B-IgG1.

Figura 9. Inhibición de la secreción de TARC desde los
monocitos humanos primarios. Se recolectó sangre humana de
voluntarios adultos sanos. Se aislaron las células mononucleares
sangre periférica mediante centrifugación de densidad Ficoll. Los
monocitos se aislaron utilizando el kit de Aislamiento de Monocitos II
(Miltenyi Biotec). Los monocitos recién aislados se incubaron con
los anticuerpos durante 20 minutos, seguido por un tratamiento de
24 horas con 1 nanogramo/mililitro de la TSLP humana. La cantidad
de TARC secretada se determinó mediante un ELISA de
emparedado. Los anticuerpos se utilizaron en el intervalo de
concentraciones de 6.7×10^{-13} a 6.7×10^{-8} M, como se indica. La
 IC_{50} es de 11 ± 10 pM para NV164-1-IgG1, y de 10 ± 4 pM para
NV115-3B-IgG1.

Figuras 10A a C. Datos farmacocinéticos de mono-
cinomolgo con una sola dosis. Se determinó la cantidad de
anticuerpo restante en sangre mediante ELISA de competencia. El
aumento de la titulación de anticuerpo libre observado que se

presentó en los puntos del tiempo posteriores, sugiere que el anticuerpo marcado estaba enlazado con anticuerpos anti-idiotípicos, y por consiguiente, no estuvo disponible para el enlace con la placa ELISA. Esto a su vez sugiere inmunogenicidad.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se predica en parte sobre el desarrollo por los presentes inventores de anticuerpos antagonistas contra el TSLPR humano. Los anticuerpos anti-hTSLPR generados en ratón, o los anticuerpos anti-hTSLPR quiméricos creados *in vitro*,
10 fueron capaces de inhibir las actividades mediadas por la señalización de TSLP, por ejemplo, la proliferación celular mediada por TSLP. Por consiguiente, estos anticuerpos son útiles como agentes terapéuticos o profilácticos contra un número de enfermedades o trastornos mediados por, o asociados con, las
15 actividades de señalización de TSLP, por ejemplo enfermedades inflamatorias alérgicas, tales como dermatitis atópica y asma. Las siguientes secciones proporcionan una guía para hacer y usar las composiciones de la invención, y para llevar a cabo los métodos de la invención.

20

I. Definiciones

25

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que es entendido comúnmente por los expertos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a un experto una definición

general de muchos de los términos utilizados en esta invención:

Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Smith y colaboradores (editores), Oxford University Press (edición revisada, 2000); Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Singleton y colaboradores (Editores), John Wiley & Sons (3PrdP edición, 2002); y A Dictionary of Biology (Referencia de Portada de Oxford), Martin y Hine (Editores), Oxford University Press (4PthP edición, 2000). En adición, se proporcionan las siguientes definiciones para asistir el lector en la práctica de la invención.

10 Con el objeto de que la presente invención pueda ser más fácilmente entendida, primero se definen ciertos términos. Se estipulan definiciones adicionales a través de toda la descripción detallada.

15 El término "respuesta inmunológica" se refiere a la acción de, por ejemplo, los linfocitos, las células presentadoras de antígeno, las células fagocíticas, los granulocitos, y las macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o por el hígado (incluyendo anticuerpos, citoquinas, y complementos), que dan como resultado un daño selectivo a, la destrucción de, o la
20 eliminación del cuerpo humano de, los patógenos invasores, las células o tejidos infectados con patógenos, las células cancerosas, o, en los casos de autoinmunidad o inflamación patológica, las células o tejidos humanos normales.

25 Una "senda de transducción de señales" se refiere a la relación bioquímica entre una variedad de moléculas de

transducción de señales que tienen una función en la transmisión de una señal desde una porción de una célula hasta otra porción de una célula.

El término "anticuerpo", como es referido en la presente, incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de enlace de antígeno (es decir, "porción de enlace de antígeno"), o cadenas individuales de los mismos. Un "anticuerpo" que se presenta naturalmente, es una glicoproteína que comprende cuando menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada está comprendida de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como V_H), y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está comprendida de tres dominios, CH1, CH2, y CH3. Cada cadena ligera está comprendida de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como V_L), y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida de un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden estar adicionalmente subdivididas en regiones de hipervariabilidad, denominadas como regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con las regiones que están más conservadas, denominadas como regiones de estructura (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres regiones determinantes de complementariedad y cuatro regiones de estructura configuradas desde el término amino hasta el término carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3,

CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de enlace que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar el enlace de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluyendo diferentes células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras), y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

El término "porción de enlace de antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de antígeno"), como se utiliza en la presente, se refiere a la longitud completa o a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retengan la capacidad para enlazarse específicamente con un antígeno (por ejemplo, TSLPR). Se ha demostrado que la función de enlace de antígeno de un anticuerpo puede ser llevada a cabo por los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de los fragmentos de enlace abarcados dentro del término "porción de enlace de antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente consistente en los dominios V_L , V_H , C_L , y $CH1$; un fragmento $F(ab)_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente de disulfuro en la región de articulación; un fragmento Fd consistente en los dominios V_H y $CH1$; un fragmento Fv consistente en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward y colaboradores, 1989 *Nature* 341:544-546), el cual consiste en un dominio V_H ; y una región determinante de complementariedad (CDR)

aislada.

Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, son codificados por genes separados, se pueden unir, empleando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les haga posible formarse como una sola cadena de proteína, en donde se emparejan las regiones V_L y V_H para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de una sola cadena (scFv); véase, por ejemplo, Bird y colaboradores, 1988 *Science* 242:423-426; y Huston y colaboradores, 1988 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883). También se pretende que estos anticuerpos de una sola cadena sean abarcados dentro del término "porción de enlace de antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen empleando las técnicas convencionales conocidas por los expertos en este campo, y los fragmentos se rastrean para determinar la utilidad de la misma manera en que se hace con los anticuerpos intactos.

Un "anticuerpo aislado", como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tengan diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se enlace específicamente con TSLPR está sustancialmente libre de anticuerpos que se enlacen específicamente con antígenos diferentes del TSLPR). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se enlaza específicamente con TSLPR, puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de TSLPR de otras especies. Más aún, un anticuerpo



aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o de productos químicos.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se utilizan en la presente, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de una sola composición molecular. Una composición de anticuerpo monoclonal exhibe una sola especificidad de enlace y afinidad por un epítipo particular.

El término "anticuerpo humano", como se utiliza en la presente, pretende incluir los anticuerpos que tienen regiones variables en donde tanto las regiones de estructura como las regiones determinantes de complementariedad se derivan a partir de secuencias de origen humano. Adicionalmente, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de estas secuencias humanas, por ejemplo las secuencias de la línea germinal humana, o de versiones mutadas de las secuencias de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias humanas (por ejemplo, las mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro*, o mediante mutación somática *in vivo*).

El término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a los anticuerpos que exhiben una sola especificidad de enlace, que tienen regiones variables, en donde tanto las regiones de estructura como las regiones determinantes de complementariedad, se derivan

102

a partir de secuencias humanas. En una modalidad, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye una célula-B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada y un transgén de cadena ligera humanos fusionados con una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se utiliza en la presente, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, se expresan, se crean, o se aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que sea transgénico o transcromosómico para los genes de inmunoglobulina humanos, o un hibridoma preparado a partir de los mismos, los anticuerpos aislados a partir de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo de un transfectoma, los anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos de combinación, recombinantes, y los anticuerpos preparados, expresados, creados, o aislados por cualquier otro medio que involucre el empalme de toda o una porción de una secuencia de un gen de inmunoglobulina humano con otras secuencias de ADN. Estos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en donde las regiones de estructura y las regiones determinantes de complementariedad se derivan a partir de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas modalidades, sin embargo, estos anticuerpos humanos recombinantes se pueden someter a

mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utilice un animal transgénico para las secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*), y por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes, son secuencias que, aunque
5 se deriven de, y estén relacionadas con, las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, no pueden existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humano *in vivo*.

Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en donde: (a) la región constante, o una porción de la misma, es
10 alterada, reemplazada, o intercambiada, de tal manera que el sitio de enlace de antígeno (región variable) se enlaza con una región constante de una clase, función efectora, y/o especie diferente o alterada, o de una molécula enteramente diferente que confiera nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo una
15 enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, es alterada, reemplazada, o intercambiada con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada. Por ejemplo, como se muestra en los Ejemplos más adelante, un anticuerpo anti-
20 hTSLPR de ratón se puede modificar reemplazando su región constante con la región constante de una inmunoglobulina humana. Debido al reemplazo con una región constante humana, el anticuerpo quimérico puede retener su especificidad en el reconocimiento del TSLPR humano, mientras que tiene la
25 antigenicidad reducida en el humano, comparándose con el

anticuerpo de ratón original.

Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo que retiene la reactividad de un anticuerpo no humano, mientras que es menos inmunogénico en humanos. Esto se puede lograr, por ejemplo, reteniéndolo las regiones determinantes de complementariedad no humanas, y reemplazando las partes restantes del anticuerpo con sus contrapartes humanas (es decir, la región constante así como las porciones de estructura de la región variable). Véase, por ejemplo, Morrison y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 81:6851-6855, 1984; Morrison y Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92, 1988; Verhoeven y colaboradores, *Science*, 239:1534-1536, 1988; Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498, 1991; y Padlan, *Molec. Immun.*, 31:169-217, 1994. Otros ejemplos de la tecnología de ingeniería humana incluyen, pero no se limitan a, la tecnología Xoma dada a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5,766,886.

El término "Humaneering" (humanodiseño), como se utiliza en la presente, se refiere a un método para convertir los anticuerpos no humanos en anticuerpos humanos diseñados (véase, por ejemplo, KaloBios' Humaneering^{MR} technology).

Como se utiliza en la presente, "isotipo" se refiere a una clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgE, IgG, tal como IgG1 ó IgG4) que es proporcionada por los genes de la región constante de cadena pesada.

Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un

anticuerpo específico para un antígeno", se utilizan de una manera intercambiable en la presente, con el término "un anticuerpo que se enlaza específicamente con un antígeno".

5 Como se utiliza en la presente, un anticuerpo que "se enlaza específicamente con el TSLPR humano", se refiere a un anticuerpo que se enlaza con el TSLPR humano con una K_D de 200×10^{-12} M o menos, de 150×10^{-12} M o menos, o de 100×10^{-12} M o menos.

10 El término "especificidad de enlace", como se utiliza en la presente, se refiere a la capacidad de un sitio de combinación de anticuerpo individual para reaccionar solamente con un determinante antigénico. El sitio de combinación del anticuerpo se localiza en la porción Fab de la molécula, y se construye a partir de las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera. La
15 afinidad de enlace de un anticuerpo es la fuerza de la reacción entre un solo determinante antigénico y un solo sitio de combinación sobre el anticuerpo. Es la suma de las fuerzas de atracción y de rechazo que operan el determinante antigénico y el sitio de combinación del anticuerpo. La afinidad es la constante de equilibrio
20 que describe la reacción del antígeno-anticuerpo.

El enlace específico entre dos entidades significa un enlace con una constante de equilibrio (K_A) de cuando menos 1×10^7 M⁻¹, 10^8 M⁻¹, 10^9 M⁻¹, ó 10^{10} M⁻¹. La frase "se enlaza específicamente (o selectivamente)" con un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-
25 hTSLPR), se refiere a una reacción de enlace que determina la

presencia de un antígeno cognado (por ejemplo, un polipéptido de TSLPR humano), en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. En adición a la constante de equilibrio (K_A) mencionada anteriormente, un anticuerpo anti-hTSLPR de la invención típicamente tiene también una constante de disociación (K_D) DE aproximadamente $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o más baja, y se enlaza con el TSLPR humano con una afinidad que es cuando menos dos veces mayor que su afinidad para el enlace con un antígeno no específico (por ejemplo, albúmina de suero bovino). Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno", se utilizan de una manera intercambiable en la presente con el término "un anticuerpo que se enlaza específicamente con un antígeno".

El término "epítipo" significa un determinante de proteína capaz de enlazarse específicamente con un anticuerpo. Los epítopos normalmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas, tales como cadenas laterales de aminoácidos o de azúcar, y usualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos de conformación y no de conformación se distinguen porque se pierde el enlace con los primeros pero no con los últimos en la presencia de solventes desnaturizantes.

El término "ácido nucleico" se utiliza en la presente de una manera intercambiable con el término "polinucleótido", y se refiere a

ADP

desoxi-ribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos, en una forma ya sea de una sola cadena o bien de doble cadena. El término abarca los ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos de estructura base modificados o enlaces, que son sintéticos, que se presentan naturalmente, y que se presentan no naturalmente, los cuales tienen propiedades de enlace similares a las del ácido nucleico de referencia, y que son metabolizados de una manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de estos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, ribonucleótidos de 2-O-metilo, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs).

A menos que se indique de otra manera, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca de una manera implícita las variantes conservadoramente modificadas del mismo (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. De una manera específica, como se detalla más adelante, se pueden lograr sustituciones de codones degenerados mediante la generación de secuencias en donde la tercera posición de uno o más (o todos los) codones seleccionados está sustituida con residuos de bases mixtas y/o de desoxi-inosina (Batzer y colaboradores, *Nucleic Acid Res.* 19:5081, 1991; Ohtsuka y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608, 1985; y Rossolini y colaboradores, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98, 1994).

El término "aminoácido" se refiere a los aminoácidos que se presentan naturalmente y sintéticos, así como a los análogos de aminoácidos y a los miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos que se presentan naturalmente. Los aminoácidos que se presentan naturalmente son aquéllos codificados por el código genético, así como los aminoácidos que son modificados posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxi-glutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a los compuestos que tienen la misma estructura química básica que el aminoácido que se presenta naturalmente, es decir, un átomo de carbono alfa que está enlazado con un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, o un grupo R, por ejemplo homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina-metil-sulfonio. Estos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo norleucina) o estructuras base de péptido modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que el aminoácido que se presenta naturalmente. Los miméticos de aminoácidos se refieren a los compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de una manera similar a un aminoácido que se presenta naturalmente.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan de una manera intercambiable en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en donde uno o más residuos de

aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido que se presenta naturalmente correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos que se presentan naturalmente y a los polímeros de aminoácidos que no se presentan naturalmente. A menos que se indique de otra manera, una secuencia de polipéptido particular también abarca implícitamente las variantes conservadoramente modificadas de la misma.

El término "variante conservadoramente modificada" se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes conservadoramente modificadas se refieren a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o en donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, hasta secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por consiguiente, en cada posición en donde una alanina sea especificada por un codón, el codón puede ser alterado hasta cualquiera de los codones correspondientes descritos, sin alterar el polipéptido codificado. Estas variaciones de ácidos nucleicos son las "variaciones silenciosas", las cuales son una especie de variaciones conservadoramente modificadas. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente que codifique un polipéptido, también describe cada

NO

variación silenciosa posible del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es ordinariamente el único codón para metionina, y TGG, que es ordinariamente el único codón para triptófano), puede ser
5 modificado para producir una molécula funcionalmente idéntica. De conformidad con lo anterior, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifique un polipéptido, es implícita en cada secuencia descrita.

Para las secuencias de polipéptido, las "variantes
10 conservadoramente modificadas" incluyen las sustituciones, supresiones, o adiciones individuales a una secuencia de polipéptido, que dan como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan los aminoácidos funcionalmente
15 similares son bien conocidas en la técnica. Estas variantes conservadoramente modificadas son en adición a, y no excluyen, las variantes polimórficas, los homólogos inter-especies, y los alelos de la invención. Los siguientes ocho grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras unos por otros:

- 20 1) Alanina (A), Glicina (G);
 2) Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
 4) Arginina (R), Lisina (K);
 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina
25 (V);

6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);

7) Serina (S), Treonina (T); y

8) Cisteína (C), Metionina (M);

(Véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984)).

5 Los términos "idéntica" o porcentaje de "identidad", en el
contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de
polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias
que son iguales. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si
las dos secuencias tienen un porcentaje especificado de residuos de
10 aminoácidos o de nucleótidos que son iguales (es decir, identidad
del 60 por ciento, opcionalmente identidad del 65 por ciento, del 70
por ciento, del 75 por ciento, del 80 por ciento, del 85 por ciento,
del 90 por ciento, del 95 por ciento, o del 99 por ciento sobre una
región especificada, o, cuando no se especifique, sobre la
15 secuencia entera), cuando se comparan y quedan alineadas para
una máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, o
la región designada como medida utilizando uno de los siguientes
algoritmos de comparación de secuencias, o mediante alineación
manual e inspección visual. Opcionalmente, existe identidad sobre
20 una región que es de cuando menos aproximadamente 50
nucleótidos (o de 10 aminoácidos) de longitud, o más
preferiblemente sobre una región que es de 100 a 500 ó 1,000 o
más nucleótidos) o de 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.

Para la comparación de secuencias, típicamente una
25 secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la cual se

comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en una computadora, se designan las coordenadas de las subsecuencias, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Se pueden utilizar los parámetros del programa por omisión, o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se utiliza en la presente, incluye la referencia a un segmento de cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionadas a partir del grupo que consiste en desde 20 hasta 600, usualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más usualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en donde se pueda comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que queden las dos secuencias óptimamente alineadas. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en este campo. La alineación óptima de las secuencias para comparación se puede conducir, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J.



Mol. Biol. 48:443, 1970, mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EUA* 85:2444, 1988, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el

5 Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Brent y colaboradores, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (Ringbou, Edición 2003)).

10 Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y de similitud de secuencias, son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul y colaboradores, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, 1977; y en Altschul y colaboradores, *J. Mol. Biol.* 215:403-

15 410, 1990, respectivamente. El software para llevar a cabo los análisis BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo involucra identificar primeramente los pares de secuencias de alto puntaje (HSPs), mediante la identificación de palabras cortas de longitud W

20 en la secuencia pedida, que concuerdan o satisfacen algún puntaje umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T es referido como el umbral de puntaje de palabra vecina (Altschul y colaboradores, *supra*). Estos impactos de palabra vecina iniciales

25 actúan como siembras para iniciar las búsquedas con el fin de

encontrar HSPS más largos que las contengan. Los impactos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia por tanto como se pueda aumentar el puntaje de alineación acumulativo. Los puntajes acumulativos se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntaje de recompensa para un par de residuos emparejados; siempre >0), y N (puntaje de multa para los residuos mal emparejados; siempre <0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntaje para calcular el puntaje acumulativo.

La extensión de los impactos de palabra en cada dirección se detiene cuando: el puntaje de alineación acumulativo cae fuera por la cantidad X de su máximo valor alcanzado; el puntaje acumulativo llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntaje negativo; o se llega al final de cualquier secuencia. Los parámetros W, T, y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como omisión una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$, y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por omisión una longitud de palabra de 3, una expectativa (E) de 10, y las alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$, y una comparación de ambas cadenas en la matriz de puntaje BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 89:10915, 1989).

El algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis

15

estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90:5873-5787, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual se presentaría por azar un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de la suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0.2, más preferiblemente menor de aproximadamente 0.01, y de una manera muy preferible menor de aproximadamente 0.001.

De otra manera que no sea el porcentaje de identidad de secuencia mencionado anteriormente, otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticos, es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico reaccione de manera cruzada inmunológicamente con los anticuerpos reproducidos contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe en seguida. Por lo tanto, un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solamente por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas, es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan una a la otra bajo condiciones restringentes, como se describe más adelante.

MB

Todavía otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas, es que se pueden utilizar los mismos cebadores para amplificar la secuencia.

5 El término "operativamente enlazado" se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de polinucleótido (por ejemplo, ADN). Típicamente, se refiere a la relación funcional de una secuencia reguladora de transcripción con una secuencia transcrita. Por ejemplo, una secuencia promotora o potenciadora está operativamente enlazada con una secuencia de codificación si
10 estimula o modula la transcripción de la secuencia de codificación en una célula huésped apropiada, o en otro sistema de expresión. En términos generales, las secuencias reguladoras de transcripción del promotor que se enlazan operativamente con una secuencia transcrita, están físicamente contiguas a la secuencia transcrita, es
15 decir, son de acción *cis*. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras de transcripción, tales como las potenciadoras, no necesitan estar físicamente contiguas o localizadas en estrecha proximidad a las secuencias de codificación cuya transcripción potencia.

20 El término "vector" pretende referirse a una molécula de polinucleótido capaz de transportar otro polinucleótido con el que se ha enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un ciclo de ADN de doble cadena circular, en donde se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector
25 viral, en donde se pueden ligar segmentos adicionales de ADN en el

117

genoma viral. Ciertos vectores son capaces de tener réplica autónoma en una célula huésped en donde se introduzcan (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de réplica bacteriano, y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped después de introducirse en la célula huésped, y de esta manera se replican junto con el genoma del huésped. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes con los que se enlazan operativamente. Estos vectores son referidos en la presente como "vectores de expresión recombinante (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante, están con frecuencia en la forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se pueden utilizar de una manera intercambiable, debido a que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus defectuosos en réplica, adenovirus, y virus adeno-asociados), los cuales sirven para funciones equivalentes.

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), se refiere a una célula en donde se ha introducido un vector de expresión recombinante. Se debe entender que estos términos pretenden referirse no solamente a la célula objetivo particular, sino a la progenie de esta célula. Debido a que

se pueden presentar ciertas modificaciones en las siguientes generaciones debido a cualquier mutación o influencias del medio ambiente, esta progenie, de hecho, puede ser o no idéntica a la célula progenitora, pero todavía se incluyen dentro del alcance del término "célula huésped", como se utiliza en la presente.

El término "enfermedad o condición inflamatoria" se refiere a cualquier condición caracterizada por inflamación local en un sitio de lesión o infección, e incluye enfermedades autoinmunes, ciertas formas de estados inflamatorios infecciosos, actividad de neutrófilos indeseable característica de los trasplantes de órganos u otros implantes, y virtualmente cualquier otra condición caracterizada por una acumulación indeseada de neutrófilos en un sitio de tejido local. Estas condiciones incluyen, pero no se limitan a, meningitis, edema cerebral, artritis, nefritis, síndrome de insuficiencia respiratoria de adultos, pancreatitis, miositis, neuritis, enfermedades del tejido conectivo, flebitis, arteritis, vasculitis, alergia, anafilaxis, erliquiosis, gota, trasplantes de órganos, y/o colitis ulcerativa.

El término "sujeto" incluye animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, y reptiles. Excepto cuando se mencione, los términos "paciente" o "sujeto" se utilizan de una manera intercambiable en la presente.

El término "tratamiento" incluye la administración de los compuestos o agentes para prevenir o demorar el establecimiento

de los síntomas, complicaciones, o indicaciones bioquímicas de una enfermedad (por ejemplo, una enfermedad inflamatoria alérgica), para aliviar los síntomas o detener o inhibir un desarrollo adicional de la enfermedad, condición, o trastorno. El tratamiento puede ser

5 profiláctico (para prevenir o demorar el establecimiento de la enfermedad, o para prevenir la manifestación de los síntomas clínicos o subclínicos de la misma), o la supresión terapéutica o el alivio de los síntomas después de la manifestación de la enfermedad.

10 La frase "senda de transducción de señales" o "senda de señalización" (por ejemplo, la senda de señalización de TSLP), se refiere a cuando menos una reacción bioquímica, pero más comúnmente a una serie de reacciones bioquímicas, que resultan de la interacción de una célula con un compuesto o agente estimulante.

15 Por lo tanto, la interacción de un compuesto estimulante (por ejemplo, TSLP) con una célula, genera una "señal" que se transmite a través de la senda de transducción de señales, dando como resultado finalmente una respuesta celular, por ejemplo una respuesta inmunológica.

20 II. Anticuerpos Antagonistas Contra el TSLPR Humano.

1. Generalidades

La invención proporciona anticuerpos que se enlazan específicamente con el TSLPR humano. Estos anticuerpos anti-hTSLPR son capaces de antagonizar las actividades de señalización

25 mediadas por TSLP, por ejemplo la proliferación celular mediada por

120

TSLP, como se describe en los Ejemplos que se encuentran más adelante. Los métodos generales para la preparación de los anticuerpos monoclonales o policlonales son bien conocidos en este campo. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1998; Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497, 1975; Kozbor y colaboradores, *Immunology Today* 4:72, 1983; y Cole y colaboradores, páginas 77-96, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, 1985.

De una manera preferible, los anticuerpos anti-hTSLPR de la invención son monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se refieren a los anticuerpos derivados a partir de un solo clon. Se puede emplear cualquier técnica para producir anticuerpos monoclonales, con el fin de producir los anticuerpos anti-hTSLPR de la invención, por ejemplo, la transformación viral u oncogénica de los linfocitos B. Un sistema animal para la preparación de hibridomas es el sistema de murino. La producción del hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Como se ilustra en los Ejemplos que se encuentran más adelante, los anticuerpos anti-hTSLPR monoclonales se pueden preparar mediante la inmunización de un animal no humano (por ejemplo, un ratón) con un polipéptido de hTSLPR, o un fragmento, proteína de fusión, o variante de los mismos. Entonces las células-B aisladas del animal se fusionan con las células de mieloma, para generar los hibridomas productores de anticuerpos. Los anticuerpos anti-hTSLPR de ratón

monoclonales se pueden obtener mediante el rastreo de los
hibridomas en un ensayo ELISA, utilizando un polipéptido de
hTSLPR, o una proteína de fusión. En la técnica se conocen los
protocolos de inmunización y las técnicas para aislamiento de
5 esplenocitos inmunizados para la fusión. Los componentes de fusión
(por ejemplo, células de mieloma de murino) y los procedimientos de
fusión también son bien conocidos en la materia, por ejemplo,
Harlow y Lane, *supra*.

Los anticuerpos interactúan con los antígenos objetivo
10 predominantemente a través de los residuos de aminoácidos que se
localizan en las seis regiones determinantes de complementariedad
(CDRs) de cadena pesada y ligera. Típicamente, los anticuerpos
anti-hTSLPR de la invención tienen cuando menos una de sus
secuencias de CDR de cadena pesada o una de sus secuencias de
15 CDR de cadena ligera idéntica a las secuencias de CDR estipuladas
en las SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, y, 6. Algunos anticuerpos anti-
hTSLPR de la invención tienen regiones variables de cadena pesada
y de cadena ligera, respectivamente, idénticas a las secuencias
estipuladas en las SEQ ID NOs: 7 y 8.

20 Los anticuerpos anti-hTSLPR de la invención pueden ser un
anticuerpo intacto que contenga dos cadenas pesadas y dos
cadenas ligeras. También pueden ser fragmentos de enlace de
antígeno de un anticuerpo intacto o de anticuerpos de una sola
cadena. Los anticuerpos anti-hTSLPR de la invención incluyen los
25 anticuerpos producidos en un animal no humano. También incluyen

los anticuerpos modificados que sean formas modificadas del anticuerpo anti-hTSLPR estipulado en la presente. Con frecuencia, los anticuerpos modificados son anticuerpos recombinantes que tienen propiedades similares o mejoradas en relación con aquéllas del anticuerpo de ratón ejemplificado. Por ejemplo, el anticuerpo anti-hTSLPR de ratón ejemplificado en los Ejemplos que se encuentran más adelante, se puede modificar suprimiendo la región constante, y reemplazándola con una región constante diferente que pueda conducir a una mayor vida media, por ejemplo, vida media en suero, estabilidad o afinidad del anticuerpo. Los anticuerpos modificados se pueden crear, por ejemplo, construyendo vectores de expresión que incluyan las secuencias de CDR a partir del anticuerpo de ratón, injertadas sobre las secuencias de estructura a partir de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (Jones y colaboradores, 1986, *Nature* 321, 522-525). Estas secuencias de estructura se pueden obtener de las bases de datos de ADN públicas.

Algunos de los anticuerpos modificados son anticuerpos quiméricos que contienen secuencias de inmunoglobulina humana parciales (por ejemplo, las regiones constantes), y secuencias de inmunoglobulina no humana parciales. Algunos otros anticuerpos modificados son anticuerpos humanizados. En términos generales, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que es no humana. Los métodos para humanizar los anticuerpos no humanos son bien

conocidos en la materia, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,585,089 y 5,693,762; Jones y colaboradores, *Nature* 321:522-25, 1986; Riechmann y colaboradores, *Nature* 332:323-27, 1988; y Verhoeyen y colaboradores, *Science* 239:1534-36, 1988. Estos métodos se pueden emplear fácilmente para generar anticuerpos los anti-hTSLPR humanizados de la invención, utilizando cuando menos una porción de una región determinante de complementariedad a partir de un anticuerpo anti-hTSLPR no humano para sustituir a las regiones correspondientes de un anticuerpo humano. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-hTSLPR humanizados de la invención tienen las tres regiones determinantes de complementariedad en cada cadena de inmunoglobulina (es decir, SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, y 6) injertadas en las regiones de estructura humanas correspondientes.

Los anticuerpos anti-hTSLPR descritos anteriormente, pueden sufrir sustituciones, adiciones, o supresiones de aminoácidos no críticas en tanto la región variable como constante sin perder la especificidad de enlace o las funciones efectoras, o una reducción intolerable de afinidad de enlace. Usualmente, los anticuerpos que incorporan estas alteraciones exhiben una identidad de secuencia sustancial con un anticuerpo de referencia a partir del cual se derivaron. Por ejemplo, las regiones variables de cadena ligera maduras de algunos de los anticuerpos anti-hTSLPR de la invención tienen una identidad de secuencia de cuando menos

el 75 por ciento, o de cuando menos el 85 por ciento (por ejemplo, de cuando menos el 90 por ciento, tal como el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento) con la
5 secuencia de la región variable de cadena ligera madura del anticuerpo anti-hTSLPR estipulada en la SEQ ID NO: 8. De una manera similar, las regiones variables de cadena pesada de los anticuerpos típicamente muestran una identidad de secuencia de cuando menos el 75 por ciento, o de cuando menos el 85 por ciento
10 (por ejemplo, de cuando menos el 90 por ciento, tal como el 91 por ciento, el 92 por ciento, el 93 por ciento, el 94 por ciento, el 95 por ciento, el 96 por ciento, el 97 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento) con la secuencia de la región variable de cadena pesada madura del anticuerpo anti-hTSLPR estipulada en la SEQ ID NO: 7.

15 2. Anticuerpos anti-hTSLPR humanos

En la invención también se incluyen anticuerpos completamente humanos que exhiben la misma especificidad de enlace, y una afinidad de enlace comparable o mejor. Por ejemplo, los anticuerpos humanos pueden tener las mismas o mejores
20 características de enlace en relación con aquéllas de un anticuerpo humano de referencia que contenga una secuencia de región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 7, y una secuencia de región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 8. Comparándose con los anticuerpos quiméricos o humanizados, los anticuerpos anti-
25 hTSLPR humanos de la invención tienen además una antigenicidad

reducida cuando se administran a sujetos humanos.

Los anticuerpos anti-hTSLPR humanos se pueden generar empleando métodos que son conocidos en la materia. Por ejemplo, en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica con Número de Serie 10/778,726 (Publicación Número 20050008625), se ha dado a conocer un método *in vivo* para reemplazar una región variable de anticuerpo no humana con una región variable humana en un anticuerpo, mientras que se mantienen las mismas, o se proporcionan mejores características de enlace, en relación con aquéllas del anticuerpo no humano. El método se apoya en el reemplazo guiado por el epítipo de las regiones variables de un anticuerpo de referencia no humano con un anticuerpo completamente humano. El anticuerpo humano resultante en general no está relacionado estructuralmente con el anticuerpo no humano de referencia, pero se enlaza con el mismo epítipo sobre el mismo antígeno que el anticuerpo de referencia. Dicho de una manera breve, se hace posible el planteamiento de reemplazo de complementariedad guiado por el epítipo en serie, estableciendo una competencia en las células entre un "competidor" y una biblioteca de diversos híbridos del anticuerpo de referencia ("anticuerpos de prueba") por el enlace con cantidades limitantes de antígeno en la presencia de un sistema reportero que responde al enlace del anticuerpo de prueba con el antígeno. El competidor puede ser el anticuerpo de referencia o un derivado del mismo, tal como un fragmento Fv de una sola cadena. El competidor también

puede ser un ligando natural o artificial del antígeno, que se enlace con el mismo epítipo que el anticuerpo de referencia. Los únicos requerimientos del competidor son que se enlace con el mismo epítipo que el anticuerpo de referencia, y que compita con el anticuerpo de referencia por el enlace del antígeno. Los anticuerpos de prueba tienen una región-V de enlace de antígeno en común del anticuerpo de referencia no humano, y la otra región-V seleccionada aleatoriamente a partir de una fuente diversa, tal como una biblioteca de repertorio de anticuerpos humanos. La región-V común a partir del anticuerpo de referencia sirve como una guía, colocando los anticuerpos de prueba sobre el mismo epítipo del antígeno, y en la misma orientación, de tal manera que la selección se inclina hacia la fidelidad de enlace de antígeno más alta con el anticuerpo de referencia.

Se pueden utilizar muchos tipos de sistemas reporteros para detectar las interacciones deseadas entre los anticuerpos de prueba y el antígeno. Por ejemplo, los fragmentos del reportero de complemento se pueden enlazar con el antígeno y el anticuerpo de prueba, respectivamente, de tal manera que la activación del reportero mediante la complementación del fragmento solamente ocurra cuando el anticuerpo de prueba se enlace con el antígeno. Cuando se co-expresan las fusiones de anticuerpo de prueba y antígeno-fragmento de reportero con un competidor, la activación del reportero se hace dependiente de la capacidad del anticuerpo de prueba para competir con el competidor, la cual es proporcional a la

afinidad del anticuerpo de prueba por el antígeno. Otros sistemas reporteros que se pueden utilizar incluyen el reactivador de un sistema de reactivación de reportero auto-inhibidor (RAIR), como se da a conocer en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica con Número de Serie 10/208,730 (Publicación Número 20030198971), o el sistema de activación competitiva dado a conocer en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica con Número de Serie 10/076,845 (Publicación Número 20030157579).

Con el sistema de reemplazo de complementariedad guiado por el epítipo en serie, se hace la selección para identificar las células que expresen un solo anticuerpo de prueba junto con el competidor, antígeno, y los componentes reporteros. En estas células, cada anticuerpo de prueba compite uno a uno con el competidor por el enlace con una cantidad limitante de antígeno. La actividad del reportero es proporcional a la cantidad de antígeno enlazado con el anticuerpo de prueba, la cual a su vez es proporcional a la afinidad del anticuerpo de prueba por el antígeno y a la estabilidad del anticuerpo de prueba. Los anticuerpos de prueba inicialmente se seleccionan con base en su actividad en relación con aquélla del anticuerpo de referencia cuando se expresa como el anticuerpo de prueba. El resultado de la primera ronda de selección es un conjunto de anticuerpos "híbridos", cada uno de los cuales está comprendido de la misma región-V no humana a partir del anticuerpo de referencia, y una región-V humana a partir de la

biblioteca, y cada una de las cuales se enlaza con el mismo epítopo sobre el antígeno que el anticuerpo de referencia. Uno o más de los anticuerpos híbridos seleccionados en la primera ronda tendrán una afinidad por el antígeno comparable a, o más alta que, aquélla del anticuerpo de referencia.

En el segundo paso de reemplazo de la región-V, las regiones-V humanas seleccionadas en el primer paso se utilizan como guía para la selección de los reemplazos humanos para la región-V del anticuerpo de referencia no humano restante, con una biblioteca diversa de regiones-V humanas cognadas. Los anticuerpos híbridos seleccionados en la primera ronda también se pueden utilizar como competidores para la segunda ronda de selección. El resultado de la segunda ronda de selección es un conjunto de anticuerpos completamente humanos que difieren estructuralmente del anticuerpo de referencia, pero que compiten con el anticuerpo de referencia por el enlace con el mismo antígeno. Algunos de los anticuerpos humanos seleccionados se enlazan con el mismo epítopo sobre el mismo antígeno que el anticuerpo de referencia. Entre estos anticuerpos humanos seleccionados, uno o más se enlazan con el mismo epítopo con una afinidad que es comparable a, o más alta que, aquélla del anticuerpo de referencia.

Utilizando uno de los anticuerpos anti-hTSLPR de ratón o quiméricos descritos anteriormente como el anticuerpo de referencia, este método se puede emplear fácilmente para generar anticuerpos humanos que se enlacen con el TSLPR humano con la

misma especificidad de enlace y la misma o mejor afinidad de enlace. En adición, estos anticuerpos anti-hTSLPR humanos también se pueden obtener comercialmente de compañías que produzcan por costumbre anticuerpos humanos, por ejemplo,

5 KaloBios, Inc. (Mountain View, CA).

4. Otros tipos de anticuerpos anti-hTSLPR

Los anticuerpos anti-hTSLPR de la invención también incluyen anticuerpos de una sola cadena, anticuerpos biespecíficos, y anticuerpos multiespecíficos. En algunas modalidades, los

10 anticuerpos de la invención son anticuerpos de una sola cadena. Los anticuerpos de una sola cadena contienen, en una sola cadena de polipéptido establemente plegada, las regiones de enlace de antígeno a partir de tanto la cadena pesada como la cadena ligera. Como tales, los anticuerpos de una sola cadena típicamente

15 retienen la especificidad de enlace y la afinidad de los anticuerpos monoclonales, pero son de un tamaño considerablemente más pequeño que las inmunoglobulinas clásicas. Para ciertas aplicaciones, los anticuerpos de una sola cadena anti-hTSLPR de la invención pueden proporcionar muchas propiedades convenientes,

20 comparándose con un anticuerpo anti-hTSLPR intacto. Éstas incluyen, por ejemplo, una eliminación más rápida del cuerpo, mayor penetración en el tejido tanto para la formación de imágenes de diagnóstico como para la terapia, y una disminución significativa en la inmunogenicidad cuando se comparan con los anticuerpos

25 basados en ratón. Otros beneficios potenciales de utilizar los

20

anticuerpos de una sola cadena incluyen mejores capacidades de rastreo en los métodos de rastreo de alta producción, y el potencial de aplicación no parenteral.

Los anticuerpos anti-hTSLPR de una sola cadena de la invención se pueden preparar empleando métodos que se han descrito en la técnica. Los ejemplos de estas técnicas incluyen las descritas en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 4,946,778 y 5,258,498; en Huston y colaboradores, *Methods in Enzymology* 203:46-88, 1991; en Shu y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 90:7995-7999, 1993; y en Skerra y colaboradores, *Science* 240:1038-1040, 1988.

En algunas modalidades, la invención proporciona anticuerpos anti-hTSLPR derivados o enlazados con otra molécula funcional para generar una molécula biespecífica o multiespecífica que se enlaza con múltiples sitios de enlace o epítopos objetivo. La molécula funcional incluye otro péptido o proteína (por ejemplo, una citoquina, un agente citotóxico, un agente inmuno-estimulante o inhibidor, un fragmento Fab', u otro fragmento de enlace de anticuerpo, como se discute anteriormente). Por ejemplo, un anticuerpo anti-hTSLPR o una porción de enlace del mismo, se puede enlazar funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente, o de otra manera) con una o más moléculas de enlace diferentes, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido, o mimético de enlace. Por lo tanto, los anticuerpos anti-hTSLPR biespecíficos y

NB

multiespecíficos de la invención comprenden cuando menos un anticuerpo anti-hTSLPR monoclonal o un fragmento de enlace de antígeno del mismo, con una primera especificidad de enlace por el TSLPR humano, y una segunda especificidad de enlace por un

5 segundo epítipo objetivo. El segundo epítipo objetivo puede ser un receptor Fc, por ejemplo un FcγR1 humano, o un receptor de Fcγ humano. Por consiguiente, la invención incluye moléculas biespecíficas y multiespecíficas capaces de enlazarse tanto con las células efectoras que expresan FcγR1, FcγR, ó FcεR (por ejemplo,

10 monocitos, macrófagos, o células polimorfonucleares (PMNs)), como con las células objetivo que expresen el TSLPR humano (por ejemplo, células dendríticas CD11c+ humanas). Estas moléculas multiespecíficas (por ejemplo, biespecíficas o multiespecíficas) dirigen las células que expresan el TSLPR humano objetivo hacia

15 las células efectoras, y desencadenan las actividades de las células efectoras mediadas por el receptor Fc, tales como la fagocitosis de las células que expresan el TSLPR humano, la citotoxicidad mediada por las células dependientes de anticuerpo (ADCC), la liberación de citoquina, o la generación del anión de superóxido.

20 Las moléculas anti-hTSLPR biespecíficas y multiespecíficas de la presente invención se pueden hacer mediante métodos que se han descrito en este campo. Éstos incluyen las técnicas químicas (véase, por ejemplo, Kranz, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 78:5807, 1981), las técnicas de polidoma (véase, por ejemplo, la Patente de

25 los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,474,893), o las

132

técnicas de ADN recombinante. Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la presente invención también se pueden preparar mediante la conjugación de las especificidades de enlace constituyentes, por ejemplo las especificidades de enlace anti-FcR y anti-TSLPR humano, empleando métodos conocidos en este campo, y como se describe en la presente. Por ejemplo, cada especificidad de enlace de la molécula biespecífica y multiespecífica se puede generar por separado, y luego se pueden conjugar unas con otras. Cuando las especificidades de enlace son proteínas o péptidos, se pueden utilizar una variedad de agentes de acoplamiento o de reticulación para la conjugación covalente. Los ejemplos de los agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodi-imida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), N-succinimidil-3-(2-piridil-ditio)-propionato (SPDP), y sulfo-succinimidil-4-(N-maleimido-metil)-ciclohexan-1-carboxilato (sulfo-SMCC). Cuando las especificidades de enlace son anticuerpos (por ejemplo, dos anticuerpos humanizados), se pueden conjugar por medio del enlace de sulfhidrilo de las regiones de articulación del término C de las dos cadenas pesadas. La región de articulación se puede modificar para contener un número no de residuos de sulfhidrilo, por ejemplo uno, antes de la conjugación.

El enlace de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas con sus objetivos específicos se puede confirmar mediante el ensayo inmunosorbente enlazado con enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), o un ensayo Wester blot. Cada uno de estos



ensayos detecta en general la presencia de los complejos de proteína-anticuerpo de interés particular, mediante el empleo de un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos de FcR-anticuerpo se pueden detectar utilizando, por ejemplo, un anticuerpo enlazado con enzima o un fragmento de anticuerpo que reconozca y se enlace específicamente con los complejos de anticuerpo-FcR. De una manera alternativa, los complejos se pueden detectar utilizando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar radioactivamente, y se puede utilizar en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, 'B., *Principles of Radioimmunoassays*, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, Marzo de 1986). El isótopo radioactivo se puede detectar por medios tales como el uso de un contador γ , o un contador de cintilación, o mediante auto-radiografía.

III. Polinucleótidos, Vectores, y Células Huésped para Producir Anticuerpos anti-hTSLPR.

La invención proporciona polinucleótidos sustancialmente purificados (ADN ó ARN) que codifican polipéptidos que comprenden segmentos o dominios de las cadenas del anticuerpo anti-hTSLPR descritas anteriormente. Algunos de los polinucleótidos de la invención comprenden la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 9 y/o la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera

134

mostrada en la SEQ ID NO: 10. Algunos otros polinucleótidos de la invención comprenden secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas (por ejemplo, cuando menos el 65 por ciento, el 80 por ciento, el 95 por ciento, o el 99 por ciento) a las

5 secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NOs: 9, 10, 21, ó 22. Cuando se expresan a partir de los vectores de expresión apropiados, los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos son capaces de exhibir una capacidad de enlace de antígeno.

En la invención también se proporcionan polinucleótidos

10 que codifican cuando menos una región CDR, y usualmente las tres regiones CDR de la cadena pesada o ligera del anticuerpo anti-hTSLPR estimulado anteriormente. Algunos otros polinucleótidos codifican todas o sustancialmente todas las secuencias de región variable de la cadena pesada y/o de la cadena ligera del anticuerpo

15 anti-hTSLPR estipulado anteriormente. Por ejemplo, algunos de estos polinucleótidos codifican la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 7 y/o la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 8. De una manera alternativa, algunos

20 de estos polinucleótidos codifican la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 21 y/o la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 22. Debido a la degeneración del código, una variedad de secuencias de ácidos nucleicos codificarán

25 cada una de las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina.

Los polinucleótidos de la invención pueden codificar solamente la secuencia de región variable de un anticuerpo anti-hTSLPR. También pueden codificar tanto una región variable como una región constante del anticuerpo. Algunas de las secuencias del polinucleótido de los ácidos nucleicos de la invención codifican una

5 secuencia de la región variable de cadena pesada madura que es sustancialmente idéntica (por ejemplo, cuando menos el 80 por ciento, el 90 por ciento, o el 99 por ciento) a la secuencia de la región variable de cadena pesada madura estipulada en la SEQ ID

10 NO: 7 ó 21. Algunas otras secuencias del polinucleótido codifican una secuencia de la región variable de cadena ligera madura que es sustancialmente idéntica (por ejemplo, cuando menos el 80 por ciento, el 90 por ciento, o el 99 por ciento) a la secuencia de la región variable de cadena ligera madura estipulada en la SEQ ID

15 NO: 8 ó 22. Algunas de las secuencias de polinucleótido codifican un polipéptido que comprende regiones variables de tanto la cadena pesada como la cadena ligera del anticuerpo de ratón. Algunos otros polinucleótidos codifican dos segmentos de polipéptido que son respectivamente sustancialmente idénticos a las regiones

20 variables de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo de ratón.

Las secuencias de polinucleótido se pueden producir mediante síntesis de ADN en fase sólida *de novo*, o mediante mutagénesis con reacción en cadena de la polimerasa de una

25 secuencia existente (por ejemplo, las secuencias descritas en los

136

Ejemplos que se encuentran más adelante), que codifique un anticuerpo anti-hTSLPR o su fragmento de enlace. La síntesis química directa de los ácidos nucleicos se puede llevar a cabo mediante los métodos conocidos en este campo, tales como el método de fosfotriéster de Narang y colaboradores, 1979, *Meth. Enzymol.* 68:90; el método de fosfodiéster de Brown y colaboradores, *Meth. Enzymol.* 68:109, 1979; el método de fosforamidita de Beaucage y colaboradores, *Tetra. Lett.*, 22:1859, 1981; y el método de soporte sólido de la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,458,066. La introducción de mutaciones a una secuencia de polipéptido mediante reacción en cadena de la polimerasa se puede llevar a cabo como se describe, por ejemplo, en *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H. A. Erlich (Editor), Freeman Press, NY, NY, 1992; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis y colaboradores, (Editores), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila y colaboradores, *Nucleic Acids Res.* 19:967, 1991; y Eckert y colaboradores, *PCR Methods and Applications* 1:17, 1991.

También en la invención se proporcionan vectores de expresión y células huésped para producir los anticuerpos anti-hTSLPR descritos anteriormente. Se pueden emplear diferentes vectores de expresión para expresar los polinucleótidos que codifican las cadenas del anticuerpo anti-hTSLPR o fragmentos de enlace. Tanto los vectores de expresión basados en virus como no virales se pueden utilizar para producir los anticuerpos en una

132

célula huésped de mamífero. Los vectores y sistemas no virales incluyen plásmidos, vectores episomales, típicamente con un casete de expresión para expresar una proteína o ARN, y cromosomas artificiales individuales (véase, por ejemplo, Harrington y colaboradores, *Nat Genet* 15:345, 1997). Por ejemplo, los vectores no virales útiles para la expresión de los polinucleótidos y polipéptidos anti-hTSLPR en células de mamífero (por ejemplo, humanas), incluyen pThioHis A, B, y C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B, y C, (Invitrogen, San Diego, CA), los vectores MPSV, y otros numerosos vectores conocidos en la técnica para expresar otras proteínas. Los vectores virales útiles incluyen los vectores basados en retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus de herpes, vectores basados en SV40, virus de papilloma, virus HBP Epstein Barr, vectores de virus de vacuna, y virus Semliki Forest (SFV). Véase Brent y colaboradores, *supra*; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49:807, 1995; y Rosenfeld y colaboradores, *Cell* 68:143, 1992.

La elección del vector de expresión depende de las células huésped pretendidas en donde se vaya a expresar el vector. Típicamente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (por ejemplo, potenciadoras), que se enlazan operativamente con los polinucleótidos que codifiquen una cadena o fragmento de anticuerpo anti-hTSLPR. En algunas modalidades, se emplea un promotor inducible para impedir la expresión de las secuencias insertadas, excepto bajo condiciones de inducción. Los promotores inducibles incluyen, por ejemplo,

238

arabinosa, lacZ, promotor de metalotioneína, o un promotor de choque por calor. Los cultivos de los organismos transformados se pueden expandir bajo condiciones no inductoras sin inclinar la población para las secuencias de codificación cuyos productos de expresión sean mejor tolerados por las células huésped. En adición a los promotores, también se pueden requerir o desear otros elementos reguladores para una expresión eficiente de una cadena o fragmento de anticuerpo anti-hTSLPR. Estos elementos típicamente incluyen un codón de inicio ATG, y el sitio de enlace de ribosoma adyacente y otras secuencias. En adición, la eficiencia de la expresión se puede mejorar mediante la inclusión de potenciadores apropiados para el sistema celular que se esté utilizando (véase, por ejemplo, Scharf y colaboradores, *Results Probl. Cell Differ.* 20:125, 1994; y Bittner y colaboradores, *Meth. Enzymol.*, 153:516, 1987). Por ejemplo, el potenciador de SV40 o el potenciador de CMV se pueden utilizar para aumentar la expresión en células huésped de mamífero.

Los vectores de expresión también pueden proporcionar una posición de la secuencia de la señal de secreción para formar una proteína de fusión con los polipéptidos codificados por las secuencias anticuerpo anti-hTSLPR insertadas. Más frecuentemente, las secuencias de anticuerpo anti-hTSLPR insertadas se enlazan con una secuencia de señal antes de incluirse en el vector. Los vectores que se van a utilizar para recibir las secuencias que codifiquen los dominios variables de cadena ligera y

139

pesada del anticuerpo anti-hTSLPR, algunas veces también codifican las regiones o partes constantes de las mismas. Estos vectores muestran expresión de las regiones variables como proteínas de fusión con las regiones constantes, conduciendo de esta manera a la producción de anticuerpos intactos o fragmentos de los mismos. Típicamente, estas regiones constantes son humanas.

Las células huésped para alojar y expresar las cadenas del anticuerpo anti-hTSLPR pueden ser procarióticas o eucarióticas. *E. coli* es un huésped procariótico útil para la clonación y expresión de los polinucleótidos de la presente invención. Otros huéspedes microbianos adecuados para utilizarse incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacteriáceas, tales como *Salmonella*, *Serratia*, y diferentes especies de *Pseudomonas*. En estos huéspedes procarióticos, también se pueden hacer vectores de expresión, los cuales típicamente contienen secuencias de control de expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de réplica). En adición, estará presente cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (TRP), un sistema promotor de beta-lactamasa, o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores típicamente controlan la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias del sitio de enlace de ribosoma, y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción. También se pueden emplear otros

MO

microbios, tales como levadura, para expresar los polipéptidos anti-hTSLPR de la invención. También se pueden utilizar células de insecto en combinación con los vectores de baculovirus.

En algunas modalidades preferidas, se utilizan células huésped de mamífero para expresar y producir los polipéptidos anti-hTSLPR de la presente invención. Por ejemplo, pueden ser una línea celular de hibridoma que exprese genes de inmunoglobulina endógenos (por ejemplo, el clon de hibridoma de mieloma 1D6.C9, como se describe en los Ejemplos), o una línea celular de mamífero que aloje un vector de expresión exógeno (por ejemplo, las células de mieloma SP2/0 ejemplificadas más adelante). Éstas incluyen cualquier célula animal o humana mortal normal, o normal, o inmortal anormal. Por ejemplo, se han desarrollado un número de líneas de células huésped adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas, incluyendo las líneas celulares CHO, diferentes líneas celulares COS, células HeLa, líneas celulares de mieloma, células-B transformadas, e hibridomas. El uso del cultivo celular de tejido de mamífero para expresar polipéptidos se discute en genera, por ejemplo, en Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N. Y., N. Y., 1987. Los vectores de expresión para células de mamífero pueden incluir secuencias de control de expresión, tales como un origen de réplica, un promotor, y un potenciador (véase, por ejemplo, Queen, y colaboradores, *Immunol. Rev.* 89:49-68, 1986), y los sitios de información de procesamiento necesarios, tales como los sitios de enlace de ribosoma, los sitios

M

de empalme de ARN, los sitios de poliadenilación, y las secuencias terminadoras de transcripción. Estos vectores de expresión normalmente contienen vectores derivados a partir de genes de mamífero o a partir de virus de mamífero. Los promotores adecuados pueden ser constitutivos, específicos del tipo de célula, específicos de la etapa, y/o modulables o regulables. Los promotores útiles incluyen, pero no se limitan a, el promotor de metalotioneína, el promotor tardío mayor de adenovirus constitutivo, el promotor de MMTV inducible por dexametasona, el promotor de XV40, el promotor de MRP polIII, el promotor de MPSV constitutivo, el promotor de CMV inducible por tetraciclina (tal como el promotor de CMV inmediato-temprano humano), el promotor de CMV constitutivo, y combinaciones de promotores-potenciadores conocidas en este campo.

Los métodos para introducir vectores de expresión que contengan las secuencias de polinucleótidos de interés varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, comúnmente se utiliza la transfección con cloruro de calcio para las células procarióticas, mientras que se puede utilizar tratamiento con fosfato de calcio o electroporación para otros huéspedes celulares. (Véase en general Sambrook, y colaboradores, *supra*). Otros métodos incluyen, por ejemplo, electroporación, tratamiento con fosfato de calcio, transformación mediada por liposomas, inyección y microinyección, métodos balístico, virosomas, inmunoliposomas, conjugados de polimerización:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones

112

artificiales, fusión con la proteína estructural del virus de herpes VP22 (Elliot y O'Hare, *Cell* 88:223, 1997), absorción de ADN mejorada por el agente, y transducción *ex vivo*. Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, con frecuencia se deseará la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresen establemente las cadenas o fragmentos de enlace del anticuerpo anti-hTSLPR, se pueden preparar utilizando los vectores de expresión de la invención, los cuales contienen orígenes de réplica virales o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. En seguida de la introducción del vector, se puede permitir a las células crecer durante 1 a 2 días en un medio enriquecido, antes de cambiarse al medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento de las células que expresan con éxito las secuencias introducidas en el medio selectivo. Las células resistentes, establemente transfectadas, pueden proliferar utilizando técnicas de cultivo de tejido apropiadas para el tipo de célula.

IV. Propiedades de los Anticuerpos Anti-hTSLPR.

Una vez que se expresa un anticuerpo anti-hTSLPR descrito anteriormente a partir de un vector de expresión en una célula huésped, o endógenamente en un hibridoma, se puede purificar fácilmente del medio de cultivo y de las células huésped. Usualmente, las cadenas de anticuerpo se expresan con secuencias de señales, y por lo tanto, se liberan hacia el medio de cultivo. Sin

MB

embargo, si las cadenas de anticuerpo no son naturalmente secretadas por las células huésped, las cadenas de anticuerpo se pueden liberar mediante su tratamiento con un detergente ligero. Entonces las cadenas de anticuerpo se pueden purificar mediante
5 métodos convencionales, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, cromatografía por afinidad para el objetivo inmovilizado, cromatografía en columna, electroforesis en gel, y similares. Estos métodos son bien conocidos y rutinariamente practicados en la materia, por ejemplo, Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag,
10 NY, 1982; y Harlow y Lane, *supra*.

A manera de ejemplo, los hibridomas seleccionados que expresen los anticuerpos anti-hTSLPR de la invención se pueden hacer crecer en matraces centrífugos de 2 litros para la purificación del anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes se pueden filtrar y
15 concentrar antes de la cromatografía por afinidad con proteína A-Sepharose, o proteína G-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ). La IgG eluida se puede verificar mediante electroforesis en gel y mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento para asegurar la pureza. La solución reguladora se puede intercambiar
20 con suero regulado con fosfato, y se puede determinar la concentración mediante la lectura de la OD280. Los anticuerpos monoclonales se pueden poner en alícuotas, y se pueden almacenar a -80°C.

Sin importar su método de preparación, los anticuerpos
25 monoclonales anti-hTSLPR de la presente invención se enlazan

específicamente con hTSLPR o con un fragmento antigénico del mismo. El enlace específico existe cuando la constante de disociación para el enlace del anticuerpo con el hTSLPR o un fragmento antigénico del mismo es $\leq 1 \mu\text{M}$, de preferencia $\leq 100 \text{ nM}$, y más preferiblemente $\leq 1 \text{ nM}$. La capacidad de un anticuerpo para enlazarse con hTSLPR se puede detectar marcando el anticuerpo de interés directamente, o el anticuerpo puede no estar marcado, y se detecta el enlace indirectamente utilizando diferentes formatos de ensayo de emparejado. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *supra*.

Los anticuerpos que tengan esta especificidad de enlace tienen más probabilidades de compartir las propiedades convenientes exhibidas por el anticuerpo anti-hTSLPR de ratón 1D6.C9 discutido en los Ejemplos que se encuentran más adelante.

Los anticuerpos monoclonales anti-TSLPR de la invención son capaces de antagonizar las actividades de señalización mediadas por TSLP. Estas actividades incluyen, por ejemplo, secreción de las quimiocinas de atracción T_H2 por las células dendríticas, tales como TARC y MDC; activación de las células dendríticas, expansión de las células-T $CD4^+$ puras y polarización hasta un fenotipo T_H2 , producción de citoquinas no alérgicas, tales como IL-4, IL-5, IL-13 $TNF\alpha$. Se pueden emplear un número de ensayos para determinar si un anticuerpo anti-hTSLPR puede inhibir las actividades celulares mediadas por TSLP. Éstos incluyen, por ejemplo, cualquiera de los ensayos descritos en los Ejemplos, tales como el ensayo de proliferación celular utilizando células

MS

Ba/F3/hTSLPR/hIL7R α , el ensayo de reportero de luciferasa utilizando células Ba/F3/hTSLPR/IL7R α /Stat5-Luc, y el ensayo de secreción de TARC. También se han descrito en la técnica ensayos adicionales para medir las actividades de señalización de TSLP.

5 Véase, por ejemplo, Reche y colaboradores, *J. Immunol.*, 167:336-43, 2001; y Isaksen y colaboradores, *J Immunol.* 168:3288-94, 2002.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-hTSLPR de la invención bloquean o compiten con el enlace de un anticuerpo anti-hTSLPR de referencia que tenga las secuencias de región variable

10 estipuladas en las SEQ ID NO: 7, y con un polipéptido de hTSLPR. Éstos pueden ser anticuerpos anti-hTSLPR completamente humanos, como se describe en lo anterior. También pueden ser otros anticuerpos anti-hTSLPR de ratón, quiméricos, o humanizados, que se enlacen con el mismo epítipo que el

15 anticuerpo de referencia. La capacidad para bloquear o competir con el enlace del anticuerpo de referencia indica que un anticuerpo anti-hTSLPR bajo prueba se enlaza con el mismo epítipo o uno similar al definido por el anticuerpo de referencia, o con un epítipo que está suficientemente proximal al epítipo enlazado por el

20 anticuerpo anti-hTSLPR de referencia. Estos anticuerpos tienen en especial probabilidades de compartir las propiedades convenientes identificadas para el anticuerpo de referencia. La capacidad para bloquear o competir con el anticuerpo de referencia se puede determinar, por ejemplo, mediante un ensayo de enlace de

25 competencia. Con un ensayo de enlace de competencia, el

MLB

anticuerpo bajo prueba se examina para determinar su capacidad para inhibir el enlace específico del anticuerpo de referencia con un antígeno común, tal como un polipéptido de TSLPR. Un anticuerpo de prueba compite con el anticuerpo de referencia por el enlace específico con el antígeno si un exceso del anticuerpo de prueba inhibe sustancialmente el enlace del anticuerpo de referencia. La inhibición sustancial significa que el anticuerpo de prueba reduce el enlace específico del anticuerpo de referencia usualmente por cuando menos el 10 por ciento, el 25 por ciento, el 50 por ciento, el 75 por ciento, o el 90 por ciento.

Existen un número de ensayos de enlace de competencia conocidos que se pueden utilizar para evaluar la competencia de un anticuerpo anti-hTSLPR con el anticuerpo anti-hTSLPR de referencia, por el enlace con el TSLPR humano. Éstos incluyen, por ejemplo, radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), radioinmunoensayo enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA), ensayo de competencia de emparedado (véase Stahl y colaboradores, *Methods in Enzymology* 9:242-253, 1983); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (véase Kirkland y colaboradores, *J. Immunol.* 137:3614-3619, 1986); ensayo marcado directo en fase sólida, ensayo de emparedado marcado directo en fase sólida (véase Harlow y Lane, *supra*); RIA de marca directa en fase sólida utilizando una marca de I-125 (véase Morel y colaboradores, *Molec. Immunol.* 25:7-15, 1988); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (Cheung y colaboradores, *Virology*

147

176:546-552, 1990); y RIA marcado directo (Moldenhauer y colaboradores, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82, 1990). Típicamente, este ensayo involucra el uso del antígeno purificado enlazado con una superficie sólida o células que lleven cualquiera de los mismos, un anticuerpo anti-hTSLPR de prueba no marcado, y un anticuerpo de referencia marcado. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marca enlazada a la superficie sólida o a las células en la presencia del anticuerpo de prueba. Usualmente, el anticuerpo de prueba está presente en un exceso. Los anticuerpos identificados mediante el ensayo de competencia (anticuerpos competidores) incluyen los anticuerpos que se enlazan con el mismo epítipo que el anticuerpo de referencia, y los anticuerpos que se enlazan con un epítipo adyacente suficientemente proximal al epítipo enlazado por el anticuerpo de referencia para que ocurra el impedimento estérico.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-TSLPR seleccionados se enlazan con epítipos únicos, cada anticuerpo se puede biotinilar utilizando reactivos comercialmente disponibles (por ejemplo, reactivos de Pierce, Rockford, IL). Los estudios de competencia utilizando anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados, se pueden llevar a cabo utilizando placas ELISA recubiertas con el polipéptido de TSLPR. El enlace del anticuerpo monoclonal biotinilado se puede detectar con una sonda de estreptavidina-fosfatasa alcalina. Con el fin de determinar el isotipo de un anticuerpo anti-TSLPR purificado,

MB

se pueden llevar a cabo ELISAs de isotipo. Por ejemplo, los pozos de las placas de microtitulación se pueden recubrir con 1 microgramo/mililitro de IgG anti-humana durante la noche a 4°C. Después de bloquear con albúmina de suero bovino al 1 por ciento, las placas se hacen reaccionar con 1 microgramo/mililitro o menos del anticuerpo monoclonal anti-hTSLPR, o con los controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante 1 a 2 horas. Luego los pozos se pueden hacer reaccionar ya sea con la IgG1 humana o bien con las ondas conjugadas con fosfatasa alcalina específicas de la IgM humana. Entonces las placas se desarrollan y se analizan, de tal manera que se puede determinar el isotipo del anticuerpo purificado.

Con el objeto de demostrar el enlace de los anticuerpos monoclonales anti-hTSLPR a las células vivas que expresen un polipéptido de hTSLPR, se puede emplear citometría de flujo. Dicho de una manera breve, las líneas celulares que expresen hTSLPR (cultivadas bajo condiciones de cultivo convencionales) se pueden mezclar con diferentes concentraciones de un anticuerpo anti-hTSLPR en suero regulado con fosfato conteniendo albúmina de suero bovino al 0.1 por ciento y suero fetal de becerro al 10 por ciento, y se incuban a 37°C durante 1 hora. Después de lavarse, las células se hacen reaccionar con anticuerpo IgG anti-humano marcado con fluoresceína bajo las mismas condiciones que el teñido del anticuerpo primario. Las muestras se pueden analizar mediante el instrumento FACScan utilizando las propiedades de dispersión de

MA

luz y lateral hacia la compuerta sobre las células individuales. Se puede utilizar un ensayo alternativo utilizando el microscopio de fluorescencia (en adición a, o en lugar de) el ensayo de citometría de flujo. Las células se pueden teñir exactamente como se describe anteriormente, y se examinan mediante el microscopio de fluorescencia. Este método permite hacer la visualización de las células individuales, pero puede tener una sensibilidad disminuida, dependiendo de la densidad del antígeno.

Los anticuerpos anti-hTSLPR de la invención se pueden probar adicionalmente para determinar su reactividad con un polipéptido de hTSLPR o un fragmento antigénico, mediante Western blot. Brevemente, los polipéptidos de hTSLPR purificados o las proteínas de fusión, o los extractos celulares de las células que expresen TSLPR, se pueden preparar y someter a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a las membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero fetal de becerro al 10 por ciento, y se sondean con los anticuerpos monoclonales que se vayan a probar. El enlace de la IgG humana se puede detectar utilizando fosfatasa alcalina anti-IgG humana, y se desarrolla con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

V. Andamiajes que no son de Inmunoglobulina

Se pueden emplear una amplia variedad de estructuras o andamiajes de anticuerpo/inmunoglobulina, siempre que el

50

polipéptido resultante incluya cuando menos una región de enlace que sea específica para la proteína objetivo. Estas estructuras o andamiajes incluyen los cinco idiotipos principales de las inmunoglobulinas humanas, o fragmentos de las mismas (tales como se dan a conocer en cualquier otra parte de la presente), e incluyen las inmunoglobulinas de otras especies de animales, que de preferencia tengan aspectos humanizados. Los anticuerpos de cadena pesada individuales, tales como aquéllos identificados en los camélidos, son de un interés particular en este aspecto. Las estructuras, andamiajes, y fragmentos novedosos continúan siendo descubiertos y desarrollados por los expertos en este campo.

En un aspecto, la invención pertenece a la generación de anticuerpos no basados en inmunoglobulina, utilizando andamiajes que no son de inmunoglobulina, sobre los cuales se pueden injertar las regiones determinantes de complementariedad de la invención. Se pueden emplear estructuras y andamiajes que no sean de inmunoglobulina conocidos o futuros, siempre que comprendan una región de enlace específica para la proteína objetivo. Estos compuestos son conocidos en la presente como "polipéptidos que comprenden una región de enlace específica del objetivo". Las estructuras o andamiajes que no son de inmunoglobulina conocidos incluyen, pero no se limitan a, Adnectinas (fibronectina) (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), anquirina (Molecular Partners AG, Zurich, Suiza), anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd (Cambridge, MA) y Ablynx nv (Zwijnaarde, Bélgica)), lipocalina (Anticalina)

SA

(Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), productos inmuno-farmacéuticos modulares pequeños (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxicuerpos (Avidia, Inc. (Mountain View, CA)), Proteína A (Affibody AG, Suecia), y afilina (gamma-cristalina o ubiquitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania).

(i) Adnectinas - Compound Therapeutics.

Los andamiajes de adnectina se basan en el dominio de fibronectina tipo III (por ejemplo, el décimo módulo de la fibronectina tipo III (dominio 10 Fn3)). El dominio de fibronectina tipo III tiene 7 u 8 cadenas beta que están distribuidas entre dos hojas beta, que ellas mismas se empaquetan unas contra otras para formar el núcleo de la proteína, y que además contienen ciclos (análogos a las regiones determinantes de complementariedad), que conectan las cadenas beta unas con otras, y se exponen al solvente. Hay cuando menos tres de estos ciclos en cada orilla del emparejado de hojas beta, en donde la orilla es el límite de la proteína perpendicular a la dirección de las hojas beta. (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,818,418).

Estos andamiajes basados en fibronectina no son una inmunoglobulina, aunque el pliegue global está estrechamente relacionado con aquél del fragmento de anticuerpo funcional más pequeño, la región variable de la cadena pesada, que comprende la unidad de reconocimiento de antígeno entera en la IgG de camello y de llama. Debido a esta estructura, el anticuerpo que no es de inmunoglobulina imita a las propiedades de enlace de antígeno que

152

son de una naturaleza y afinidad similares a aquéllas de los anticuerpos. Estos andamiajes se pueden utilizar en una estrategia de selección aleatoria de ciclo y mezcla *in vitro*, que es similar al proceso de maduración por afinidad de los anticuerpos *in vitro*.

5 Estas moléculas basadas en fibronectina se pueden utilizar como andamiajes, en donde las regiones de ciclo de la molécula pueden ser reemplazadas con las regiones determinantes de complementariedad de la invención, empleando técnicas de clonación convencionales.

10 (ii) **Anquirina - Molecular Partners.**

La tecnología se basa en la utilización de proteínas con módulos de repetición derivados de anquirina como andamiajes para llevar las regiones variables que se pueden utilizar como el enlace con diferentes objetivos. El módulo de repetición de anquirina es un

15 polipéptido de 33 aminoácidos consistente en dos hélices- α anti-paralelas y una vuelta- β . El enlace de las regiones variables se optimiza en su mayor parte utilizando exhibición de ribosoma.

(iii) **Maxicuerpos/Avímeros - Avidia.**

Los avímeros se derivan a partir de la proteína que

20 contiene el dominio-A natural, tal como LRP-1. Estos dominios son utilizados por la naturaleza para las interacciones de proteína-proteína en seres humanos sobre 250 proteínas, y se basan estructuralmente en los dominios-A. Los avímeros consisten en un número de diferentes monómeros de "dominio-A" (2-10) enlazados

25 por medio de enlazadores de aminoácidos. Se pueden crear

153

avímeros que se puedan enlazar con el antígeno objetivo empleando la metodología descrita, por ejemplo, en las Publicaciones Números 20040175756; 20050053973; 20050048512; y 20060008844.

(iv) Proteína A - Affibody.

5 Los ligandos por afinidad Affibody® son pequeñas proteínas simples compuestas de un haz de tres hélices basado en el andamiaje de uno de los dominios de enlace de IgG de la Proteína A. La Proteína A es una proteína superficial de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Este dominio de andamiaje consiste en 58
10 aminoácidos, 13 de los cuales se seleccionan aleatoriamente para generar las bibliotecas Affibody® con un gran número de variantes de ligandos (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,831,012). Las moléculas Affibody® imitan a los anticuerpos, tienen un peso molecular de 6 kDa,
15 comparándose con el peso molecular de los anticuerpos, que es de 150 kDa. A pesar de su pequeño tamaño, el sitio de enlace de las moléculas Affibody® es similar a aquél de un anticuerpo.

(v) Anticalinas - Pieris.

Las Anticalinas® son productos desarrollados por la
20 compañía Pieris ProteoLab AG. Se derivan a partir de las lipocalinas, un grupo ampliamente extendido de proteínas pequeñas y robustas que normalmente están involucradas en el transporte o almacenamiento fisiológico de los compuestos químicamente sensibles o insolubles. Varias lipocalinas naturales se presentan en
25 los tejidos humanos o en los líquidos corporales.

La arquitectura de la proteína recuerda a la de las inmunoglobulinas, con ciclos hiper-variables sobre la parte superior de una estructura rígida. Sin embargo, en contraste con los anticuerpos o con sus fragmentos recombinantes, las lipocalinas
5 están compuestas de una sola cadena de polipéptido con 160 a 180 residuos de aminoácidos, siendo justo marginalmente más grande que un solo dominio de inmunoglobulina.

El conjunto de cuatro ciclos, que forma el bolsillo de enlace, muestra una plasticidad estructural pronunciada, y tolera
10 una variedad de cadenas laterales. Por consiguiente, el sitio de enlace se puede reconfigurar en un proceso registrado con el objeto de reconocer las moléculas objetivo prescritas de diferente forma con una alta afinidad y especificidad.

Una proteína de la familia de lipocalina, la proteína de
15 enlace de bilina (BBP) de *Pieris Brassicae* se ha utilizado para desarrollar anticalinas, mutando el conjunto de los cuatro ciclos. Un ejemplo de una solicitud de patente que describe las "anticalinas" es la Publicación del TCP Número PCT 199916873.

(vi) Affilin - Scil Proteins.

20 Las moléculas Affilin^{MR} son pequeñas proteínas que no son de inmunoglobulina, que se diseñan para tener afinidades específicas hacia las proteínas y las moléculas pequeñas. Las nuevas moléculas Affilin^{MR} se pueden seleccionar muy rápidamente a partir de dos bibliotecas, cada una de las cuales se basa en una
25 proteína de andamiaje derivada de ser humano diferente. Las

moléculas Affilin^{MR} no muestran ninguna homología estructural con las proteínas de inmunoglobulina. Las Scil proteins emplea dos andamiajes de Affilin^{MR}, uno de los cuales es gamma-cristalino, una proteína de lente de ojo estructural humano, y la otra es una

5 proteína de la superfamilia de "ubiquitina". Ambos andamiajes humanos son muy pequeños, muestran una alta estabilidad a la temperatura, y son casi resistentes a los cambios de pH y a los agentes desnaturalizantes. Esta alta estabilidad se debe principalmente a la estructura de hoja beta expandida de las

10 proteínas. Los ejemplos de las proteínas derivadas de gamma-cristalino se describen en la Publicación Internacional Número WO200104144, y los ejemplos de las proteínas "tipo ubiquitina" se describen en la Publicación Internacional Número WO2004106368.

VI. Aplicaciones Terapéuticas de los Anticuerpos Anti-hTSLPR.

15

Los anticuerpos anti-hTSLPR se pueden emplear en muchas aplicaciones terapéuticas o profilácticas mediante la inhibición de las actividades de señalización de TSLP. Éstas incluyen el tratamiento de enfermedades o condiciones mediadas

20 por la señalización de TSLP, tales como aquéllas que afecten al desarrollo de las células-B, al desarrollo de las células-T, a la reconfiguración genética del receptor de células-T, o a la regulación del factor de transcripción Stat5. Por ejemplo, los anticuerpos antagonistas anti-hTSLPR se pueden emplear para suprimir o

25 reducir la respuesta inmunológica indeseada mediada por la célula

956

T_H2. En particular, son adecuados para el tratamiento de pacientes humanos que sufran de trastornos inflamatorios alérgicos asociados con, o mediados por, la señalización de TSLP. Las enfermedades inflamatorias alérgicas que son susceptibles al tratamiento con los anticuerpos anti-hTSLPR de la invención incluyen, por ejemplo, (1) asma, una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias asociada con la obstrucción del flujo de aire y la hiper-respuesta bronquial; (2) dermatitis atópica, una enfermedad inflamatoria de la piel con exacerbación, crónica, que requiere de un tratamiento intermitente a largo plazo; y (3) rinitis alérgica, un trastorno inflamatorio de la mucosa nasal, mediado por los linfocitos T_H2 que están ligados con la atopia. En los Estados Unidos y en varios importantes países europeos, se espera que la prevalencia diagnosticada de asma, dermatitis atópica, y rinitis alérgica aumente desde 46 millones en el presente, hasta 53 millones, desde 31.7 millones en el presente hasta 37.2 millones, y desde 55.9 millones en el presente hasta 64.5 millones en el 2013, respectivamente. De aproximadamente el 50 al 80 por ciento de los pacientes con dermatitis atópica tienen o desarrollarán asma o rinitis alérgica.

La mayoría de los fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de alergias tienen como objetivo proporcionar un alivio sintomático, mientras que hay relativamente poco esfuerzo en el campo de la inmunomodulación para proporcionar una modificación de la enfermedad a largo plazo. Los anticuerpos anti-hTSLPR de la invención pueden proporcionar un tratamiento

157

novedoso y efectivo de los sujetos (en especial los pacientes humanos) que sufran de cualquiera de estas enfermedades alérgicas. Al impedir que la TSLPR inactive la senda de transducción de señales del receptor de TSLP, pueden bloquear la respuesta de T_H2 y la producción de citoquinas responsables tanto del inicio como del mantenimiento de la inflamación alérgica. Por consiguiente, este planteamiento tiene el potencial para inducir un efecto terapéutico a largo plazo, y un beneficio modificador de la enfermedad en los pacientes con dermatitis atópica, asma, y rinitis alérgica.

En otra modalidad, la invención proporciona una composición farmacéutica que tiene cuando menos uno de los anticuerpos anteriores, o fragmentos funcionales o variantes conservadoras, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable para los mismos.

En ciertas modalidades, la invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno o condición asociada con la presencia de una célula que tenga una hTSLP del objetivo del receptor. El método involucra administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriores. En una modalidad relacionada, el trastorno o la condición que se va a tratar es un trastorno respiratorio.

En otra modalidad, el trastorno o la condición que se va a tratar es asma bronquial, que es una enfermedad inflamatoria

persistente común del pulmón, caracterizada por hiper-respuesta de las vías respiratorias (AHR), sobre-producción de moco, fibrosis, y niveles elevados de IgE en suero.

5 En otra modalidad, el trastorno o la condición que se va a tratar es dermatitis atópica (alérgica), la cual es la enfermedad más común de la piel en la infancia, y se caracteriza por prurito intenso y placas eczematosas crónicas.

10 En otra modalidad, el trastorno o la condición que se va a tratar se selecciona a partir de otras enfermedades y condiciones inflamatorias u obstructivas de las vías respiratorias, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), lesión pulmonar aguda (ALI), síndrome de insuficiencia respiratoria aguda/de adultos (ARDS), disnea, inflamación alérgica de las vías respiratorias, enfermedad de las vías respiratorias pequeñas, carcinoma
15 pulmonar, síndrome agudo del pecho en los pacientes con enfermedad drepanocítica e hipertensión pulmonar, así como exacerbación de hiper-reactividad de las vías respiratorias a consecuencia de otra terapia con fármacos, en particular otra terapia con fármacos inhalados.

20 En otra modalidad, el trastorno o la condición que se va a tratar es bronquitis de cualquier tipo o génesis, incluyendo, por ejemplo, bronquitis aguda, viral, catarral, cruposa, crónica, o estenoide.

25 En otra modalidad, el trastorno o la condición que se va a tratar incluye neumoconiosis (una enfermedad inflamatoria,

comúnmente ocupacional, de los pulmones, con frecuencia acompañada por obstrucción de las vías respiratorias, ya sea crónica o aguda, y ocasionada por la inhalación repetida de polvos) de cualquier tipo o génesis, incluyendo, por ejemplo, aluminosas, antracosis, asbestosis, calicosis, ptilosis, siderosis, silicosis, tabacosis, y bisinosis.

En otra modalidad, el trastorno o la condición que se va a tratar se selecciona a partir de rinitis atópica (fiebre de heno) y sinusitis crónica.

En otra modalidad, el trastorno o la condición que se va a tratar se selecciona a partir de otras condiciones inflamatorias de la piel, por ejemplo soriasis o lupus eritematoso.

En otra modalidad, el trastorno o la condición que se va a tratar es enfermedad inflamatoria del intestino, tal como colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn.

En otra modalidad, el trastorno o la condición que se va a tratar se selecciona a partir de otras condiciones fibróticas, tales como esclerosis sistémica, fibrosis de hígado, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, o pulmón fibroide.

En otra modalidad, el trastorno o la condición que se va a tratar es recurrencia de tumor o metástasis. Se ha demostrado que la inhibición de las citoquinas Th2 potencia las vacunas anti-virales en los modelos animales, y puede ser benéfica en el tratamiento de VIH y otras enfermedades infecciosas [Ahlers, J. D., y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 2002].

160

En otra modalidad, el trastorno o la condición que se va a tratar es una infección viral respiratoria, la cual exacerba las condiciones crónicas subyacentes, tales como asma, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, otitis media, y sinusitis. La infección viral respiratoria tratada puede estar asociada con infección bacteriana secundaria, tal como otitis media, sinusitis, o neumonía.

En otra modalidad, el trastorno o la condición que se va a tratar se selecciona a partir de otras enfermedades o condiciones, en particular enfermedades o condiciones que tengan un componente inflamatorio, por ejemplo enfermedades de los huesos y de las articulaciones, incluyendo artritis reumatoide, artritis soriática, y otras enfermedades tales como aterosclerosis, esclerosis múltiple, y rechazo de alo-injerto agudo y crónico, por ejemplo en seguida de trasplante de corazón, riñón, hígado, pulmón, o médula ósea.

En otra modalidad, el trastorno o la condición que se va a tratar es choque endotóxico, glomerulonefritis, isquemia cerebral y cardíaca, enfermedad de Alzheimer, fibrosis quística, infecciones virales y las exacerbaciones asociadas con las mismas, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), esclerosis múltiple (MS), gastritis asociada con *Helicobacter pylori*, y cánceres, en particular el crecimiento de cáncer de ovario.

En otra modalidad, el trastorno o la condición que se va a tratar es el de los síntomas ocasionados por infección viral en un

161

ser humano, que es causada por el rinovirus humano, otros enterovirus, coronavirus, virus de herpes, virus de influenza, virus de parainfluenza, virus sincicial respiratorio, o un adenovirus.

5 El tratamiento de acuerdo con la presente invención puede ser sintomático o profiláctico.

La efectividad de un agente de la invención para inhibir las condiciones inflamatorias, por ejemplo en las enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias, se puede demostrar en un modelo animal, por ejemplo en un modelo de ratón, rata, o conejo, de inflamación de las vías respiratorias u otras condiciones inflamatorias, por ejemplo, como son descritas por Wada y colaboradores, *J. Exp. Med.* (1994) 180:1135-40; Sekido y colaboradores, *Nature* (1993) 365:654-57; Modelska y colaboradores, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med* (1999) 160:1450-56; y 10 Laffon y colaboradores, (1999) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160:1443-49.

En todavía otra modalidad, la invención proporciona un método para identificar una célula que tenga un receptor de hTSLP. Este método involucra poner en contacto la célula con cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo anteriores, que además 20 tengan una marca detectable. La marca es radioactiva, fluorescente, magnética, paramagnética, o quimiluminiscente. El método puede involucrar además cualquiera de la formación de imágenes o separación de la célula marcada anterior.

25 En otra modalidad, cualquiera de los anticuerpos o

162

fragmentos de anticuerpos humanos o humanizados son sintéticos.

En otra modalidad, la invención proporciona una composición farmacéutica y un agente terapéutico adicional.

El agente terapéutico adicional se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en sustancias de fármaco anti-inflamatorias, broncodilatadoras, anti-histamínicas, o anti-tusivas, en particular en el tratamiento de enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías respiratorias, tales como aquéllas mencionadas anteriormente en la presente, por ejemplo como potenciadores de la actividad terapéutica de estos fármacos, o como un medio para reducir la dosificación requerida o los efectos secundarios potenciales de estos fármacos. Un agente terapéutico de la invención se puede mezclar con la otra sustancia de fármaco en una composición farmacéutica fija, o se puede administrar por separado, antes, simultáneamente con, o después de la otra sustancia de fármaco. De conformidad con lo anterior, la invención incluye una combinación de un agente de la invención como se describe anteriormente en la presente, con una sustancia de fármaco anti-inflamatoria, broncodilatadora, anti-histamínica, o anti-tusiva, estando el agente de la invención y la sustancia de fármaco en la misma o en diferente composición farmacéutica.

Los fármacos anti-inflamatorios adecuados incluyen esteroides, en particular glucocorticosteroides, tales como budesonida, dipropionato de beclametasona, propionato de fluticasona, ciclesonida, o furoato de mometasona, o los esteroides

1163

descritos en las Publicaciones Internacionales Números WO 02/88167, WO 02/12266, WO 02/100879, WO 02/00679 (en especial aquéllos de los Ejemplos 3, 11, 14, 17, 19, 26, 34, 37, 39, 51, 60, 67, 72, 73, 90, 99 y 101), WO 03/35668, WO 03/48181, WO 03/62259, WO 03/64445, WO 03/72592, WO 04/39827 y WO 04/66920; agonistas del receptor glucocorticoide no esteroideos, tales como los descritos en las Patentes Números DE 10261874, WO 00/00531, WO 02/10143, WO 03/82280, WO 03/82787, WO 03/86294, WO 03/104195, WO 03/101932, WO 04/05229, WO 04/18429, WO 04/19935 y WO 04/26248; antagonistas de LTB₄, tales como BIIL 284, CP-195543, DPC11870, LTB₄-etanolamida, LY 293111, LY 255283, CGS025019C, CP-195543, ONO-4057, SB 209247, SC-53228, y aquéllos descritos en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5451700; antagonistas de LTD₄, incluyendo montelukast, pranlukast, zafirlukast, accolato, SR2640, Wy-48,252, ICI 198615, MK-571, LY-171883, Ro 24-5913 y L-648051; inhibidores de PDE₄, tales como cilomilast (Ariflo® GlaxoSmithKline), Roflumilast (Byk Gulden), V-11294A (Napp), BAY19-8004 (Bayer), SCH-351591 (Schering-Plough), Arofilina (Almirall Prodesfarma), PD189659/PD168787 (Parke-Davis), AWD-12-281 (Asta Medica), CDC-801 (Celgene), SelCID(TM) CC-10004 (Celgene), VM554/UM565 (Vernalis), T-440 (Tanabe), KW-4490 (Kyowa Hakko Kogyo), y aquéllos dados a conocer en las Publicaciones Internacionales Números WO 92/19594, WO 93/19749, WO 93/19750, WO 93/19751, WO 98/18796, WO

169

99/16766, WO 01/13953, WO 03/104204, WO 03/104205, WO
03/39544, WO 04/000814, WO 04/000839, WO 04/005258, WO
04/018450, WO 04/018451, WO 04/018457, WO 04/018465, WO
04/018431, WO 04/018449, WO 04/018450, WO 04/018451, WO
5 04/018457, WO 04/018465, WO 04/019944, WO 04/019945, WO
04/045607 y WO 04/037805; agonistas de A_{2A} , tales como los
descritos en las Patentes Números EP 1052264, EP 1241176, EP
409595A2, WO 94/17090, WO 96/02543, WO 96/02553, WO
98/28319, WO 99/24449, WO 99/24450, WO 99/24451, WO
10 99/38877, WO 99/41267, WO 99/67263, WO 99/67264, WO
99/67265, WO 99/67266, WO 00/23457, WO 00/77018, WO
00/78774, WO 01/23399, WO 01/27130, WO 01/27131, WO
01/60835, WO 01/94368, WO 02/00676, WO 02/22630, WO
02/96462, y WO 03/086408; y antagonistas de A_{2B} , tales como los
15 descritos en la Publicación Internacional Número WO02/42298.

Los fármacos broncodilatadores adecuados incluyen
agentes anticolinérgicos o antimuscarínicos, en particular bromuro
de ipratropio, bromuro de oxitropio, sales de tiotropio, y CHF 4226
(Chiesi), y glicopirrolato, pero también los descritos en las Patentes
20 Números EP 424021, US 3714357, US 5171744, WO 01/04118, WO
02/00652, WO 02/51841, WO 02/53564, WO 03/00840, WO
03/33495, WO 03/53966, WO 03/87094, WO 04/018422 y WO
04/05285; y los agonistas del adrenoceptor beta-2, tales como
albuterol (salbutamol), metaproterenol, terbutalina, salmeterol
25 fenoterol, procaterol, y en especial, formoterol, carmoterol, y las

165
sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y los
compuestos (en forma libre o de sal o de solvato) de la Fórmula I de
la Publicación Internacional Número WO00/75114, cuyo documento
se incorpora a la presente como referencia, de preferencia los
5 compuestos de los Ejemplos de la misma, en especial el compuesto
de (5-[(R)-2-(5,6-dietil-indan-2-il-amino)-1-hidroxi-etil]-8-hidroxi-1H-
quinolin-2-ona), y las sales farmacéuticamente aceptables de la
misma, así como los compuestos (en forma libre o de sal o de
solvato) de la Fórmula I de la Publicación Internacional Número WO
10 04/16601, y también los compuestos de las Patentes Números EP
1440966, JP 05025045, WO 93/18007, WO 99/64035, US
2002/0055651, WO 01/42193, WO 01/83462, WO 02/66422, WO 02/
70490, WO 02/76933, WO 03/24439, WO 03/42160, WO 03/42164,
WO 03/72539, WO 03/91204, WO 03/99764, WO 04/16578, WO
15 04/22547, WO 04/32921, WO 04/33412, WO 04/37768, WO
04/37773, WO 04/37807, WO 04/39762, WO 04/39766, WO 04/45618
WO 04/46083, WO 04/80964, EP1460064, WO 04/087142, WO
04/089892, EP 01477167, US 2004/0242622, US 2004/0229904, WO
04/108675, WO 04/108676, WO 05/033121, WO 05/040103 y WO
20 05/044787.

Los fármacos anti-inflamatorios y broncodilatadores dobles
adecuados incluyen los agonistas del adrenoceptor beta-
2/antagonistas muscarínicos dobles, tales como aquéllos dados a
conocer en las Patentes Números US 2004/0167167, WO 04/74246 y
25 WO 04/74812.

166

Las sustancias de fármaco anti-histamínicas adecuadas incluyen clorhidrato de cetirizina, acetaminofeno, fumarato de clemastina, prometazina, loratidina, desloratidina, difenhidramina, y clorhidrato de fexofenadina, activastina, astemizol, azelastina, ebastina, epinastina, mizolastina, y tefenadina, así como las que se dan a conocer en las Patentes Números JP 2004107299, WO 03/099807 y WO 04/026841.

También se pueden utilizar combinaciones de los agentes terapéuticos de la invención y los agentes anticolinérgicos o antimuscarínicos, esteroides, agonistas beta-2, inhibidores de PDE4, agonistas del receptor de dopamina, antagonistas de LDT4, o antagonistas de LTB4. Otras combinaciones de los agentes de la invención con fármacos anti-inflamatorios son aquéllas con otros antagonistas de los receptores de quimiocina, por ejemplo CCR-1, CCR-3, CCR-4, CCR-5, CCR-6, CCR-7, CCR-8, CCR-9 y CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, en particular los antagonistas de CCR-5, tales como los antagonistas Schering-Plough SC-351125, SCH-55700 y SCH-D, los antagonistas Takeda, tales como cloruro de N-[[4-[[[6,7-dihidro-2-(4-metil-fenil)-5H-benzociclo-hepten-8-il]-carbonil]-amino]-fenil]-metil]-tetrahidro-N,N-dimetil-2H-piran-4-aminio (TAK-770), los antagonistas de CCR-5 descritos en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 6166037 (en particular en las reivindicaciones 18 y 19), en la Publicación Internacional Número WO 0066558 (en particular en la reivindicación 8), en la Publicación Internacional Número WO

167

0066559 (en particular en la reivindicación 9), y en las Publicaciones Internacionales Números WO 04/018425 y WO 04/026873.

5 El agente terapéutico adicional también se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en otras moléculas de enlace de citoquina, en particular anticuerpos de otras citoquinas, en particular una combinación con un anticuerpo anti-IL4, tal como se describe en la Publicación del TCP Número PCT/EP2005/00836, un anticuerpo anti-IgE, tal como Xolair®, un anticuerpo anti-IL3, un
10 anticuerpo anti-IL31R, un anticuerpo anti-IL31R, tal como se describe en la Publicación Internacional Número WO05/007699, un anticuerpo anti-endoglina, un anticuerpo anti-IL1b, un anticuerpo anti-TSLP, u otro anticuerpo anti-hTSLPR.

Los anticuerpos antagonistas de anti-hTSLPR de la
15 invención se pueden emplear para tratar a un sujeto, tanto terapéuticamente como profilácticamente. En las aplicaciones terapéuticas, se administra una composición que comprenda un anticuerpo antagonista de anti-hTSLPR (por ejemplo, un anticuerpo anti-hTSLPR humanizado), a un sujeto ya afectado por una
20 enfermedad alérgica ocasionada por, o asociada con, la señalización de TSLP. La composición contiene el anticuerpo en una cantidad suficiente para curar, detener parcialmente, o hacer más lento detectablemente el progreso de la condición, y sus complicaciones. En las aplicaciones profilácticas, se administran las
25 composiciones que contengan a los anticuerpos monoclonales anti-

169

hTSLPR a un paciente que no esté ya sufriendo de un trastorno inflamatorio alérgico. Más bien, se dirigen a un sujeto que esté en riesgo de, o que tenga una predisposición a, desarrollar un trastorno inflamatorio alérgico. Estas aplicaciones permiten al sujeto mejorar la resistencia del paciente, o retardar el progreso de un trastorno inflamatorio alérgico mediado por la señalización de TSLP.

VII. Composiciones Farmacéuticas

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos monoclonales anti-hTSLPR (fragmentos intactos o de enlace) formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener adicionalmente otros agentes terapéuticos que sean adecuados para el tratamiento o la prevención de un trastorno alérgico dado, por ejemplo los agentes anti-alérgicos conocidos mencionados anteriormente. Los vehículos farmacéuticos mejoran o estabilizan la composición, o facilitan la preparación de la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes anti-bacterianos y anti-fúngicos, agentes isotónicos y demoradores de absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles.

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar mediante una variedad de métodos conocidos en la materia. La vía y/o el modo de administración varían dependiendo de los resultados deseados. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea, o que se

169

administre proximal al sitio del objetivo. El vehículo farmacéuticamente aceptable debe ser adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal, o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión).

5 Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, o la molécula biespecífica o multiespecífica, se puede recubrir en un material para proteger al compuesto de la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar al compuesto.

10 La composición debe ser estéril y fluida. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como de lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de la dispersión, y mediante el uso de tensoactivos. En muchos casos, es preferible
15 incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, poli-alcoholes tales como manitol o sorbitol y cloruro de sodio en la composición. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables se puede proyectar mediante la inclusión en la composición de un agente que demore la absorción, por ejemplo, monoestearato de
20 aluminio o gelatina.

 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar de acuerdo con los métodos bien conocidos y rutinariamente practicados en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Mack Publishing
25 Co., 20ª Edición, 2000; y *Sustained and Controlled Release Drug*

A20

Delivery Systems, J. R. Robinson, editor, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978. Las composiciones farmacéuticas de preferencia se elaboran bajo condiciones GMP. Típicamente, se emplea una dosis terapéuticamente efectiva o una dosis eficaz del anticuerpo anti-hTSLPR en las composiciones farmacéuticas de la invención. Los anticuerpos anti-hTSLPR se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en este campo. Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a través del tiempo, o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente, como sea indicado por las exigencias de la situación terapéutica. En especial es conveniente formular las composiciones parenterales en una forma unitaria de dosificación para una mayor facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación, como se utiliza en la presente, se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se vayan a tratar; cada unidad contiene una cantidad previamente determinada del compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente

M

activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición, y modo de administración, sin que sea tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado depende de una variedad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o del éster, la sal, o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos, y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general, e historia médica previa del paciente que se esté tratando, y factores similares.

Un médico o veterinario puede iniciar las dosis de los anticuerpos de la invención empleados en la composición farmacéutica en niveles más bajos que los requeridos para alcanzar el efecto terapéutico deseado, y puede aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. En general, las dosis efectivas de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de un trastorno inflamatorio alérgico descrito en la presente, varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo el medio de administración, el sitio objetivo, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es un ser humano u otro animal, de otros medicamentos administrados, y de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Las dosificaciones de tratamiento

necesitan titularse para optimizar la seguridad y la eficacia. Para administrarse con un anticuerpo, la dosificación está en el intervalo de aproximadamente 0.0001 a 100 miligramos/kilogramo, y más usualmente de 0.01 a 5 miligramos/kilogramo del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 1 miligramo/kilogramo de peso corporal, o de 10 miligramos/kilogramo de peso corporal, o pueden estar dentro del intervalo de 10 miligramos/kilogramo. Un régimen de tratamiento de ejemplo implica la administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses.

El anticuerpo normalmente se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosificaciones individuales pueden ser semanales, mensuales, o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, como sea indicado por la medición de los niveles en sangre del anticuerpo anti-hTSLPR en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para alcanzar una concentración del anticuerpo en plasma de 1 a 1,000 microgramos/mililitro, y en algunos métodos, de 25 a 300 microgramos/mililitro. De una manera alternativa, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanizados muestran una mayor vida media que aquélla de los anticuerpos quiméricos y de los anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de

administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En las aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo.

5 Algunos pacientes continúan recibiendo el tratamiento por el resto de sus vidas. En las aplicaciones terapéuticas, algunas veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduzca o se termine el progreso de la enfermedad, y de preferencia hasta que el paciente muestre

10 una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

En la memoria descriptiva anterior, se hace referencia primordialmente a las modalidades de la invención en lo que pertenecen al anticuerpo conocido como NVP164-1. El lector de

15 esta memoria descriptiva, sin embargo, puede asumir que se contemplan de una manera específica e individual todas las modalidades equivalentes con respecto al anticuerpo conocido como NVP163-1, y como tales, forman modalidades de la invención que

20 pueden estar sujetas a las reivindicaciones adjuntas más adelante.

EJEMPLOS

Los siguientes Ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente la invención, pero no para limitar su alcance. Otras variantes de la invención serán fácilmente evidentes para un

25 experto ordinario en la técnica, y están abarcadas por las

reivindicaciones adjuntas.

1. ELISA

Las proteínas utilizadas para el ELISA fueron hTSLPR/hFc (R&D Systems, #981-TR), hIL7R α /hFc (R&D Systems, #306-IR), o mTSLPR/hFc (R&D Systems, #546-TR). Las placas Maxisorp de 384 pozos (Nunc, Rochester, NY, # 464718) se recubrieron con 25 microlitros de 5 microgramos/microlitro de la proteína respectiva durante la noche a 4°C. Las placas recubiertas se lavaron con suero regulado con fosfato + Tween 20 al 0.05 por ciento (PBST), se bloquearon con 80 microlitros de albúmina de suero bovino al 1 por ciento en suero regulado con fosfato, y se lavaron nuevamente con PBST. Las placas se incubaron en secuencia con 20 microlitros de IgG de cabra anti-humana conjugada con HRP, anticuerpo específico de F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, #109-035-097), y 20 microlitros de sustrato TMB (KPL, # 50-76-05), y se leyeron a una absorbencia de 650 nanómetros. Las placas se lavaron con PBST entre las incubaciones. Véanse las Figuras 1, 2, 4, 5, y 6.

2. Ensayo de Gen Reportero (RGA).

Las células Ba/F3, una línea pro-células B de murino, que sobre-expresaban establemente hTSLPR/hIL7R α /Stat5-Luc, se utilizaron para el ensayo de gen reportero. Las células estables se mantuvieron en RPMI-1640 conteniendo suero bovino fetal al 10 por ciento y 10 nanogramos/mililitro de hTSLP (R&D Systems, #1398-TS/CF). Las células se lavaron con RPMI-1640 + suero bovino fetal

MS

al 10 por ciento una vez, se volvieron a suspender a 5×10^5 células/mililitro, y se sembraron a 20 microlitros/pozo en una placa de 384 pozos durante la noche, con CO₂ al 5 por ciento, en una incubadora de cultivo de tejido a 37°C. Antes de la adición de 10 microlitros de TSLP 4x (4 nanogramos/microlitro), se agregaron 10 microlitros de anticuerpo a las células, y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de 6 horas de incubación a 37°C, se agregaron 20 microlitros de Bright-Glo (Promega, #2620) a cada pozo, y la placa se leyó utilizando un lector de placas de luminiscencia. Véanse las Figuras 3, 7, y 8.

3. Caracterización Adicional

El anticuerpo anti-TSLPR referido en la Publicación Internacional Número WO2007/112146 como NV115-3B en ese documento, es un fragmento Fab de NV115-3B-IgG1. NV-115-3B-IgG1 es una IgG1 de longitud completa del fragmento Fab. NV-115-3B-IgG1 fracasó en sus estudios farmacocinéticos (PK) con primates respectivos debido a una fuerte inmunogenicidad (véase la Figura 10C más adelante), precluyendo un estudio de toxicidad de múltiples dosis subsiguiente. El anticuerpo anti-TSLPR de la '146 originalmente contenía dos subclases de secuencias de la línea germinal humana en ambas secuencias de cadena pesada y ligera, que los inventores especularon pueden dar lugar a este problema de inmunogenicidad. El candidato de la segunda generación NV164-1 se generó para tener una cadena pesada de una sola subclase y una cadena ligera de una sola subclase. El NV164-1 mostró una

especificidad de enlace con el TSLPR humano (Figura 4), reactividad cruzada con el TSLPR de cinomolgo (Figura 5), y una actividad biológica comparable en los ensayos *in vitro* (Figuras 6, 7, 8, y 9). Subsiguientemente, se probó en un estudio farmacocinético de primates con dosis altas y bajas (Figuras 10A y B). Los resultados farmacocinéticos indicaron que la dosis más alta (30 miligramos/kilogramo) generó tolerancia contra la inmunogenicidad potencial, y la dosis más baja (5miligramos/kilogramo) indujo un grado de inmunogenicidad, pero fue mucho menos inmunogénica que el NV115-3B-IgG1. De conformidad con lo anterior, parecería que el diseño de anticuerpos para este objetivo con una sola subclase de secuencias de la línea germinal tiene un efecto benéfico sobre la inmunogenicidad.

Se puede encontrar diferente información de secuencia para NV164-1 en las SEQ ID NOs: 1 a 14 más adelante.

Se puede encontrar diferente información de secuencia para NV163-1 en las SEQ ID NOs: 15 a 24 más adelante.

20

25

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o una porción de enlace de antígeno del mismo, el cual comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 7 o de la SEQ ID NO: 21.

2. Un anticuerpo aislado o una porción de enlace de antígeno del mismo, el cual comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 7, y una secuencia de la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 8, o una secuencia de la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 21, y una secuencia de la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 22.

3. El anticuerpo de la reivindicación 2, el cual comprende CDRH1, H2 y H3 de las SEQ ID NOs: 1, 2, y 3, respectivamente, o de las SEQ ID NOs: 15, 16, y 17, respectivamente, o una secuencia de CDRL1, L2 y L3 de las SEQ ID NOs: 4, 5, y 6, respectivamente, o de las SEQ ID NOs: 18, 19, y 20, respectivamente.

4. El anticuerpo de la reivindicación 2, el cual comprende las CDRH1, H2 y H3 de las SEQ ID NOs: 1, 2, y 3, respectivamente, o de las SEQ ID NOs: 15, 16, y 17, respectivamente, y una secuencia de CDRL1, L2, y L3 de las SEQ ID NOs: 4, 5, y 6, respectivamente, o de las SEQ ID NO: 18, 19, y 20, respectivamente.

5. El anticuerpo de la reivindicación 2, el cual comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que es cuando menos el 80 por ciento idéntica a la SEQ ID NO: 7, y una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera que es cuando menos el 80 por ciento idéntica a la SEQ ID NO: 8, o que comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que es cuando menos el 80 por ciento idéntica a la SEQ ID NO: 21, y una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera que es cuando menos el 80 por ciento idéntica a la SEQ ID NO: 22.
6. El anticuerpo de la reivindicación 2, el cual es un anticuerpo quimérico.
7. El anticuerpo de la reivindicación 1 ó 2, el cual comprende una región constante de cadena pesada humana y una región constante de cadena ligera humana.
8. El anticuerpo de la reivindicación 2, el cual es un anticuerpo humanizado.
9. El anticuerpo de la reivindicación 2, el cual es un anticuerpo humano.
10. El anticuerpo de la reivindicación 2, el cual es un anticuerpo de una sola cadena.
11. El anticuerpo de la reivindicación 2, el cual es un fragmento Fab.
12. El anticuerpo de la reivindicación 2, el cual es del isotipo IgG1 ó IgG3.

13. Un anticuerpo aislado, el cual comprende una cadena pesada de la SEQ ID NO: 9, y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 10.

5 14. Un polinucleótido aislado o recombinante, el cual codifica un polipéptido que comprende la región variable de la cadena pesada o la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13.

15. El polinucleótido de la reivindicación 14, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.

10 16. El polinucleótido de la reivindicación 14, en donde el polinucleótido que codifica la región variable de cadena pesada es la SEQ ID NO: 11, y el polinucleótido que codifica la región variable de cadena ligera es la SEQ ID NO: 12.

15 17. Una célula huésped aislada, la cual comprende (1) un segmento de ADN recombinante que codifica una cadena pesada del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, y (2) un segundo segmento de ADN recombinante que codifica una cadena ligera del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13; en donde estos segmentos de ADN, respectivamente, se enlazan operativamente con un primero y un segundo promotor, y se pueden
20 expresar en la célula huésped mencionada.

18. La célula huésped aislada de la reivindicación 17, en donde la célula es una línea celular de CHO ó NSO.

25 19. Un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno inflamatorio en un sujeto, comprendiendo el método

administrar al sujeto, una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13.

5 20. El método de la reivindicación 19, en donde el sujeto es un ser humano.

 21. El método de la reivindicación 19 ó 20, en donde el sujeto sufre de una enfermedad inflamatoria alérgica.

 22. El método de la reivindicación 21, en donde la enfermedad inflamatoria alérgica es dermatitis atópica, asma, o
10 rinitis alérgica.

 23. Una composición farmacéutica, la cual comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en particular para utilizarse en el método de cualquiera de las reivindicaciones 19
15 a 22.

 24. La composición de la reivindicación 23, adecuada para su administración subcutánea o intravenosa.

20

25

**RESUMEN**

En la presente invención se dan a conocer anticuerpos que reconocen específicamente y antagonizan al receptor de TSLP humano, y métodos para emplear estos anticuerpos con el fin de tratar o aminorar las enfermedades o trastornos mediados por la señalización de TSLP.

* * * * *

10

15

20

25

?

12

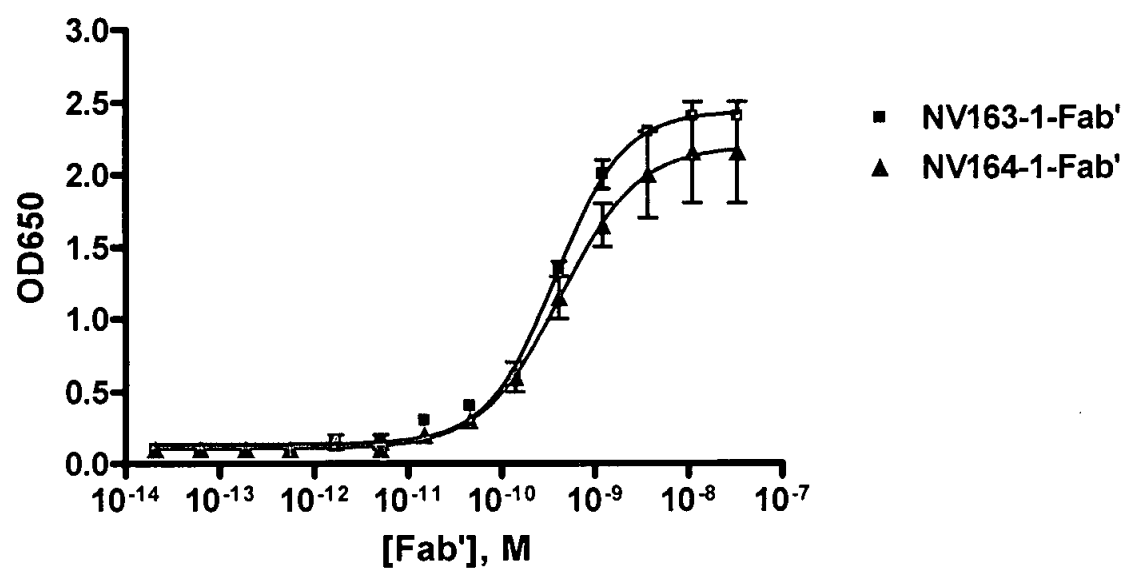


FIG. 1

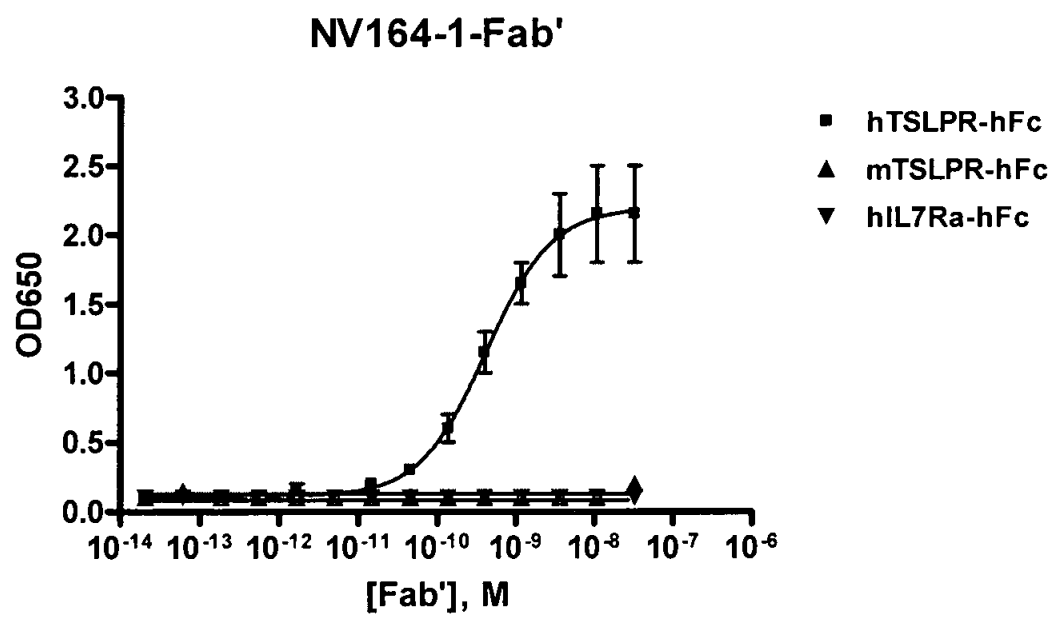
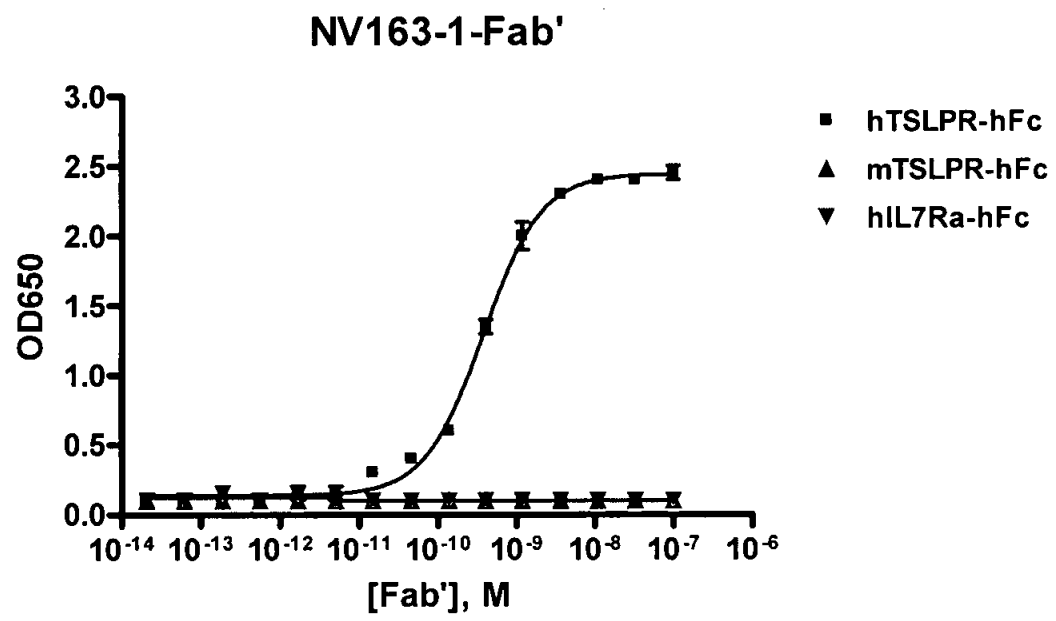


FIG. 2



Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
IRM LLC

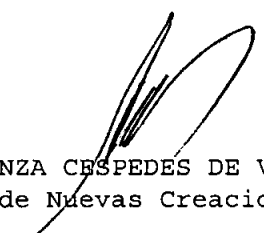
REFERENCIA	Radicación No.	9 144825
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/057731
	Fecha inicio fase nacional	20/01/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

Nº 01847

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de quince reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior, requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 12 FEB. 2010
adpall

182

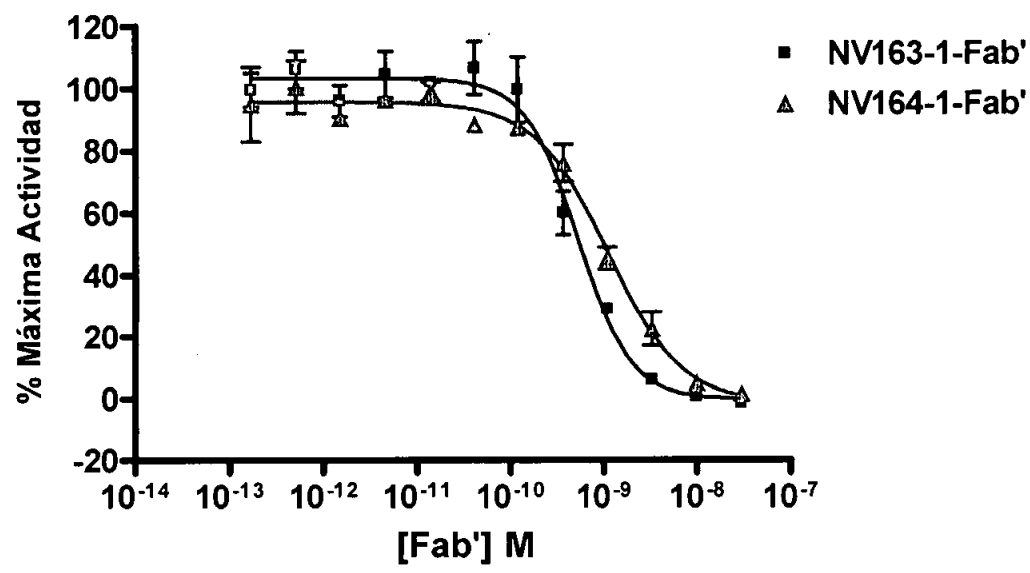


FIG. 3

185

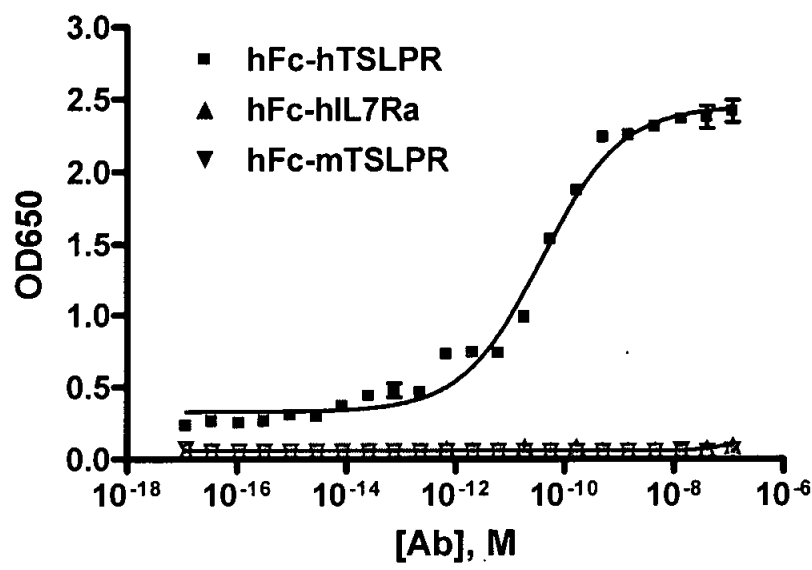


FIG. 4

186

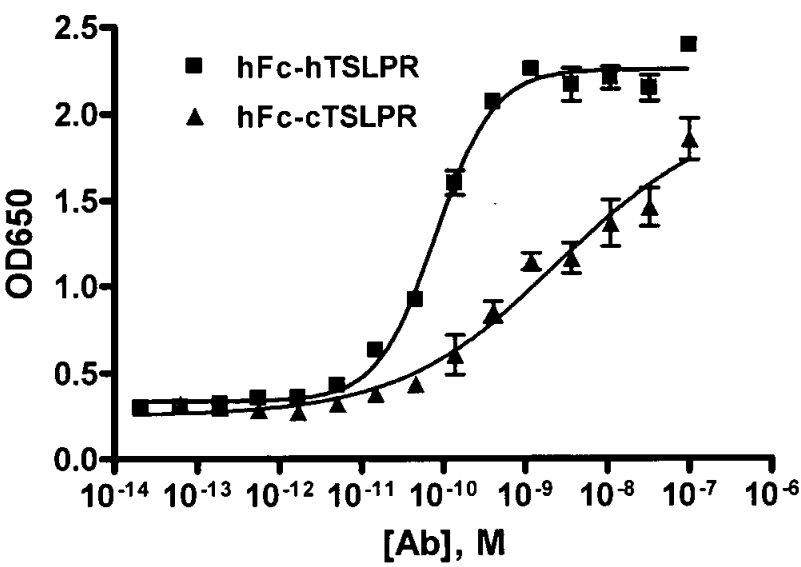


FIG. 5

Handwritten signature or initials.

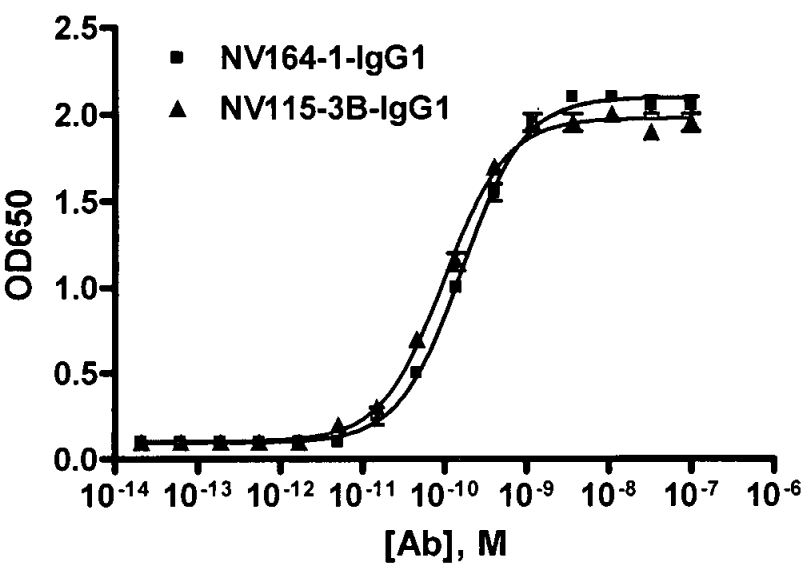


FIG. 6

156

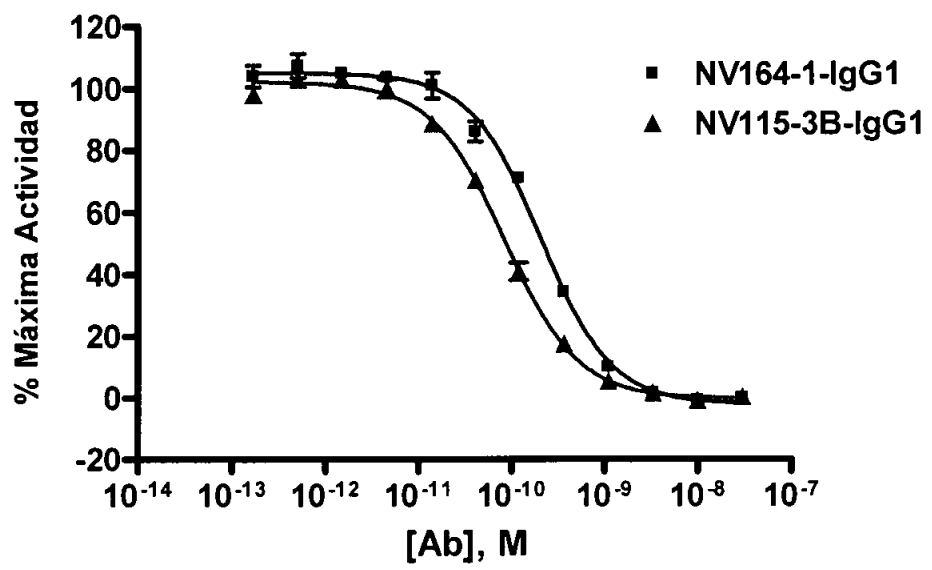


FIG. 7

[Handwritten signature]

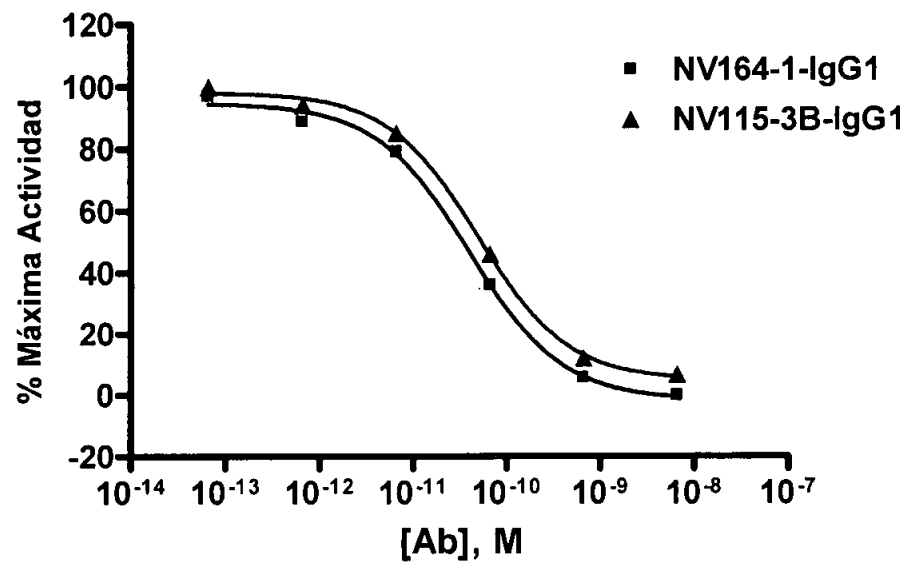


FIG. 8

190

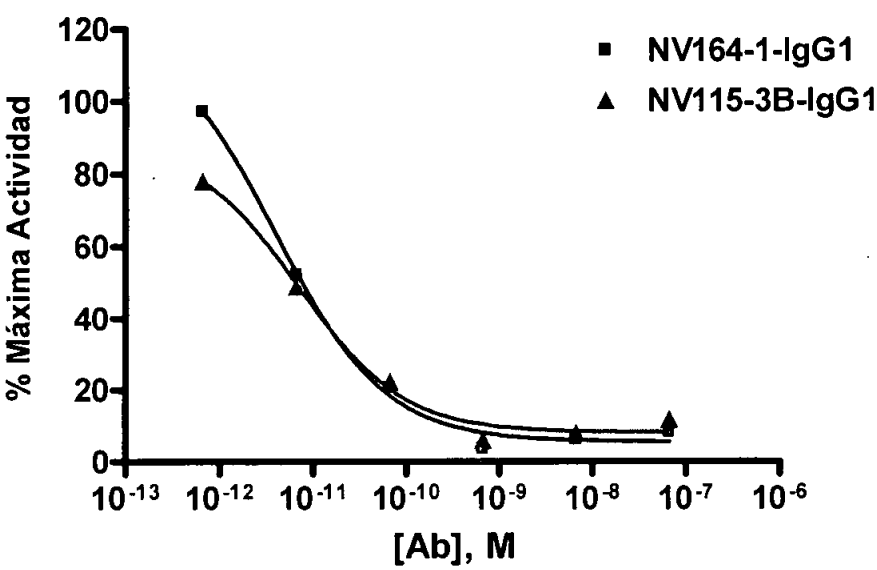


FIG. 9

191

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

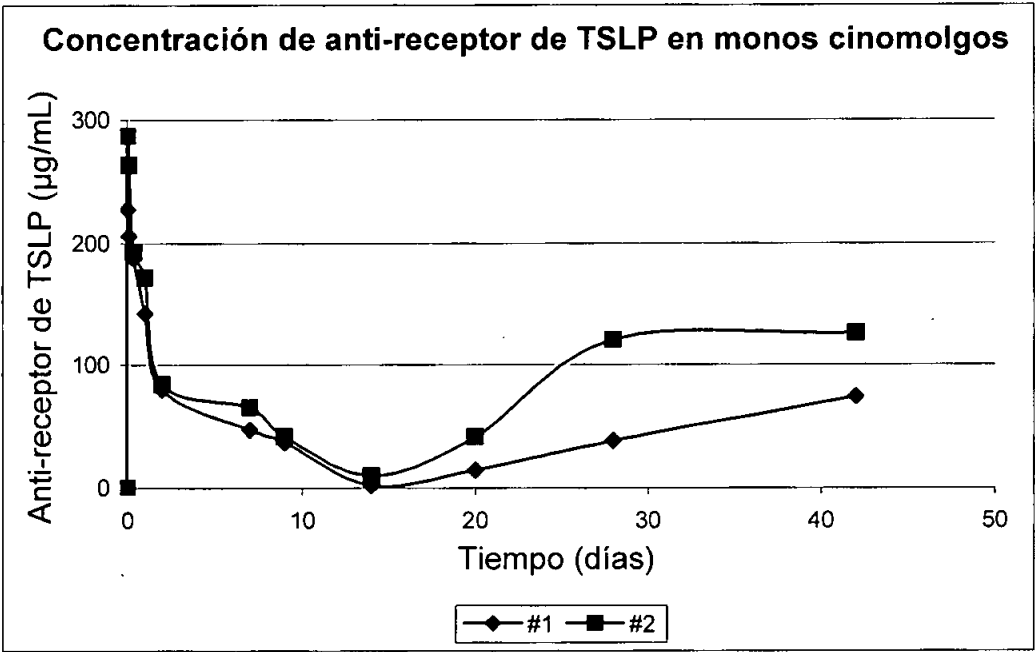


FIG. 10A

197

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

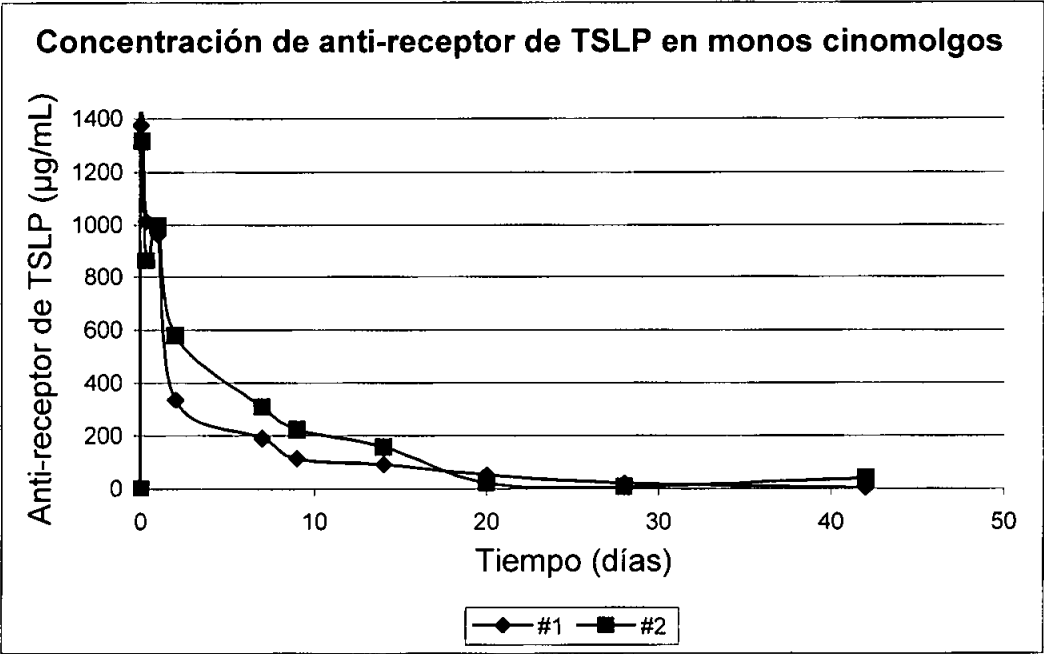


FIG. 10B

10B

C. NV115-3B-IgG1, 10 mg/kg

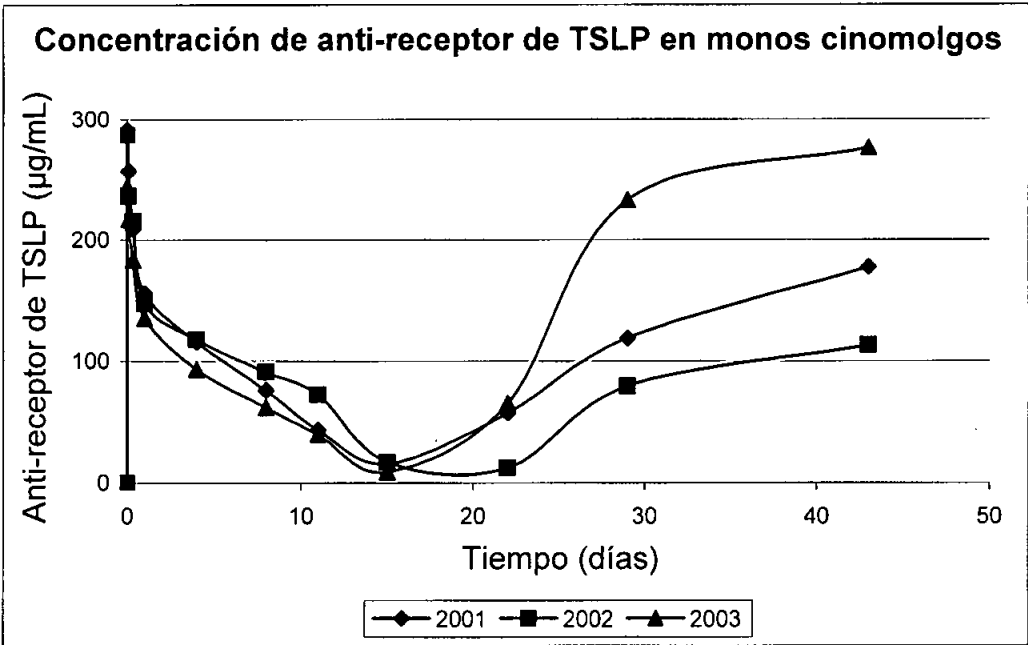


FIG. 10C

199

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NOVARTIS AG
Dong, Liquin
Nasoff, Marc

5 <120> Compuestos Orgánicos
<130> 52142
<150> US 60/945,205
<151> 2007-06-20
<160> 24

10 <170> PatentIn versión 3.3
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia humana artificial
<400> 1
Ser Tyr Gly Met Ser
1 5

20 <210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>

25 <223> Secuencia sintética: Secuencia humana artificial

<400> 2

Trp Val Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Arg Tyr Ala Gln Gly Phe Thr

1 5 10 15

Gly

5

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Secuencia sintética: Secuencia humana artificial

<400> 3

Glu Gly Phe Ile Arg Thr Val Val Gly Ala Ala Gly Arg Phe Val Tyr

1 5 10 15

15

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20

<223> Secuencia sintética: Secuencia humana artificial

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Thr Arg Leu Ala

1 5 10

<210> 5

25

<211> 7

196

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia humana artificial
 5 <400> 5
 Trp Ala Ser Thr Leu Gln Ser
 1 5
 <210> 6
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia humana artificial
 <400> 6
 15 Gln Gln Tyr Ser Ala Tyr Pro Thr
 1 5
 <210> 7
 <211> 125
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia humana artificial
 <400> 7
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 25 1 5 10 15

197

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 5 Gly Trp Val Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Arg Tyr Ala Gln Gly Phe
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 10 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Phe Ile Arg Thr Val Val Gly Ala Ala Gly Arg Phe
 100 105 110
 Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 15 <210> 8
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Secuencia sintética: Secuencia humana artificial
 <400> 8
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Thr Arg
 25 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 5 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ala Tyr Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 10 100 105
 <210> 9
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia humana artificial
 <400> 9
 Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Gly
 1 5 10 15
 20 Val Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 25 50 55 60

199

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

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 260 265 270
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 5 275 280 285
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 290 295 300
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 305 310 315 320
 10 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 325 330 335
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 340 345 350
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 15 355 360 365
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 370 375 380
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 385 390 395 400
 20 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 405 410 415
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 420 425 430
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 25 435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

5 <210> 10
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

10 <223> Secuencia sintética: Secuencia humana artificial
 <400> 10

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 15 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
 35 40 45

Ile His Thr Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 50 55 60

20 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser
 25 100 105 110

Ala Tyr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

5 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
10 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

15 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 11

<211> 375

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintética que codifica la SEQ ID NO: 7

<400> 11

25 caggtgcagc tgggtgcagag cggcagcgag ctgaagaaac ctggcgccag cgtgaaggtg 60



	tcttgcaagg ccagcggcta caccttcacc agctacggca tgagctgggt gcggcaggct	120
	ccaggacagg gactggagtg gatgggctgg gtgaacacca acaccggcaa cccagatac	180
	gcccagggct tcaccggcgg gttcgtgttc agcctggaca ccagcgtgtc caccgcctac	240
	ctgcagatca gcagcctgaa ggccgaggac accgcctgtg actactgcgc cagagagggc	300
5	ttcatccgga ccgtgggtggg agccgcggga agattcgtgt actggggcca gggcacccctg	360
	gtcacctgtc cctca	375
	<210> 12	
	<211> 318	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia sintética que codifica la SEQ ID NO: 8	
	<400> 12	
	gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagagtgacc	60
15	atcacctgcc gggccagcca ggacatccac acccggtctg cctggtatca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctactgg gccagcacc tgcagagcgg cgtgccagc	180
	cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagcag cctgcagccc	240
	gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacagcgctt accccacctt cggccagggc	300
	accaagcttg aaatcaaa	318
20	<210> 13	
	<211> 1425	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Secuencia sintética que codifica la SEQ ID NO: 9	

<400> 13

	atggccttggg tgtggacctt gccattcctg atggcagctg cccaaggtgt ccaggcacag	60
	gtgcagctgg tgcagagcgg cagcgagctg aagaaacctg gcgccagcgt gaaggtgtcc	120
	tgcaaggcca ggggctacac cttcaccage tacggcatga gctgggtgcg gcaggctcca	180
5	ggacagggac tggagtggat gggctgggtg aacaccaaca ccggcaacct cagatacgcc	240
	cagggcttca ccggccggtt cgtgttcage ctggacacca gcgtgtccac cgcctacctg	300
	cagatcagca gcctgaaggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag agagggcttc	360
	atccggaccg tgggtggagc cgccggaaga ttcgtgtact ggggccaggg caccctggtc	420
	accgtctcct cagcctccac caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctctccaag	480
10	agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc tgccctggta aggactactt cccgaacctg	540
	gtgacggtgt cgtggaactc aggcgcctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc	600
	ctacagtctt caggactcta ctccctcage agcgtcgtga ccgtgccctc cagcagcttg	660
	ggcaccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag	720
	agagttgagc ccaaattctg tgacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa	780
15	ctctctgggg gaccgtcagt ctctctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc	840
	tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtgggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc	900
	aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag	960
	gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg	1020
	ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccage ccccatcgag	1080
20	aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca	1140
	tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctat	1200
	cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc	1260
	acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct atagcaagct caccgtggac	1320
	aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac	1380
25	aaccactaca cgcagaagag cctctcctg tcccgggta aatga	1425

205

<210> 14

<211> 702

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Secuencia sintética que codifica la SEQ ID NO: 10

<400> 14

atgagtgtgc tcactcaggt cctggcgttg ctgctgctgt ggcttacagg tacgcgttgc 60

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgacc 120

10 atcacctgcc gggccagcca ggacatccac acccggtctg cctggtatca gcagaagccc 180

ggcaaggccc ccaagctgct gatctactgg gccagcacc tgacagagcgg cgtgccccagc 240

cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac ttcacctga ccatcagcag cctgcagccc 300

gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacagcgctt accccacctt cggccagggc 360

accaagcttg aaatcaaagg aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 420

15 gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480

agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgcctctc aatcgggtaa ctcccaggag 540

agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600

agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 660

agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag 702

20 <210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Secuencia sintética: Secuencia humana artificial

206

<400> 15
Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5

5 <210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia humana artificial

10 <400> 16
Trp Val Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Arg Tyr Ala Gln Gly Phe Thr
1 5 10 15
Gly

15 <210> 17
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>

20 <223> Secuencia sintética: Secuencia humana artificial
<400> 17
Glu Gly Phe Ile Arg Thr Val Val Gly Ala Ala Gly Arg Phe Val Tyr
1 5 10 15

25 <210> 18
<211> 11

207

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia humana artificial
5 <400> 18
Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Thr Arg Leu Ala
1 5 10
<210> 19
<211> 7
10 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia humana artificial
<400> 19
15 Trp Ala Ser Thr Arg Gly Ser
1 5
<210> 20
<211> 8
<212> PRT
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia sintética: Secuencia humana artificial
<400> 20
Gln Gln Tyr Ser Ala Tyr Pro Thr
25 1 5

208

<210> 21
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia humana artificial
 <400> 21
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 10 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Val Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Arg Tyr Ala Gln Gly Phe
 15 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 20 Ala Arg Glu Gly Phe Ile Arg Thr Val Val Gly Ala Ala Gly Arg Phe
 100 105 110
 Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 22
 25 <211> 106

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética: Secuencia humana artificial
 5 <400> 22
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Thr Arg
 20 25 30
 10 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 15 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ala Tyr Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 20 <210> 23
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Secuencia sintética que codifica la SEQ ID NO: 21

210

	<400>	23	
	caggtccagc	tggtgcagtc	tggtgtctgag
	ttgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc
	60		
	tcctgcaagg	cttctgggta	cacctttacc
	agctatggta	tcagttgggt	gcgacaggcc
	120		
	cccgacaag	ggcttgagtg	gatgggatgg
	gtcaacacca	acactgggaa	cccaaggtag
	180		
5	gcccagggct	tcacgggacg	gtttgtcttc
	tccttgga	cctctgtcag	tacggcatat
	240		
	ctgcagatca	gcagcctaaa	ggctgaggac
	actgccgtgt	actactgcgc	aagagaaggc
	300		
	tttattcgta	cggtagtg	tgccgccggt
	cgttttgtgt	attggggcca	aggtaccctg
	360		
	gtgaccgtga	gctcc	
	375		
	<210>	24	
10	<211>	318	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia sintética que codifica la SEQ ID NO: 22	
15	<400>	24	
	gacatccaga	tgaccagtc	tccatcttcc
	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc
	60		
	atcacttgtc	gggccagtca	ggatattcat
	actcgggttg	cttggtacca	gcagaaacca
	120		
	ggaaaagccc	ctaagctgct	catttactgg
	gcactctacc	gtggatccgg	ggtcccatca
	180		
	aggttcagtg	gaagtggatc	tgggacagat
	tttactttga	ccatcagcag	cctgcagcct
	240		
20	gaagattttg	caacctacta	ctgccagcag
	tatagcgcat	atccgacggt	tggccaaggt
	300		
	acgaaactgg	aaattaa	
	318		

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2008/057731

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

NASH, Guy
Novartis Pharma AG
Patent Department
CH-4002 Basel
SUISSE

Date of mailing (day/month/year)

08 December 2009 (08.12.2009)

Applicant's or agent's file reference

52142-WO-PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/EP2008/057731

International filing date (day/month/year)

18 June 2008 (18.06.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

IRM LLC
Hurst Holme
12 Trott Road
Hamilton, HM 11
Bermuda

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

IRM LLC
131 Front Street
Hamilton HM 12
Bermuda

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Forax Richard

e-mail pt05.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 05

Facsimile No. +41 22 338 89 75

Form PCT/IB/306 (January 2009)

I/EACL83TJ0

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/057731

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 2007/112146 A (IRM LLC; DONG LIQUN [US]; NASOFF MARC [US]) 4 October 2007 (2007-10-04) the whole document	1-24
Y	KOYAMA ET AL: "A possible role for TSLP in inflammatory arthritis" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 357, no. 1, 18 April 2007 (2007-04-18), pages 99-104, XP022029934 ISSN: 0006-291X the whole document	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 October 2008

Date of mailing of the international search report

05/11/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sommerfeld, Teresa

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/057731

213

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2005/249712 A1 (LEONARD WARREN J [US] ET AL) 10 November 2005 (2005-11-10) the whole document	1-24
Y	WO 03/065985 A (SCHERING CORP [US]) 14 August 2003 (2003-08-14) the whole document	1-24
Y	LIU YONG-JUN ET AL: "TSLP: An epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation" ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY, vol. 25, 2007, pages 193-219, XP002500846 ISSN: 0732-0582 published online on 27.11.06 the whole document	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/057731

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007112146	A	04-10-2007	AR 058983 A1	05-03-2008
			AU 2007230868 A1	04-10-2007
			EP 1981912 A2	22-10-2008
US 2005249712	A1	10-11-2005	US 2007237787 A1	11-10-2007
WO 03065985	A	14-08-2003	AU 2003208888 A1	02-09-2003
			CA 2474011 A1	14-08-2003
			EP 1487865 A2	22-12-2004
			JP 2005516606 T	09-06-2005
			MX PA04007426 A	11-10-2004
			NZ 533987 A	27-04-2007



No. 09-144825- -00000-0000

Fecha: 2009-12-17 17:00:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYH Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 214



LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patené.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO

REFERENCIA	Radicación No.	9 144825
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/057731
	Fecha inicio fase nacional	20/01/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

01846

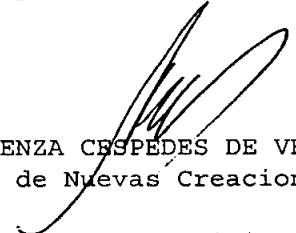
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

2. En la documentación allegada no se evidencia la existencia y representación de la sociedad solicitante, por lo tanto debe allegar el documento que así lo acredite.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 12 FEB. 2010
adpall