

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-068980-00000-0000

Fecha: 2012-04-26 16:42:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 91



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: ANTICUERPO ANTI-TSLP MODIFICADO POR TÉCNICAS
DE INGENIERIA GENÉTICA

SOLICITANTE: SCHERING CORPORATION

DIRECCIÓN: 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, NJ 07033-0530 E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 26 de Abril de 2012

P2012/000048

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCI.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-068980- -00000-0000

Fecha: 2012-04-26 16:42:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 91

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2012/000048

SOLICITUD DE:

1



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: SCHERING CORPORATION

Dirección: 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth,
NJ 07033-0530 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARE

Dirección: Carrera 5 No. 34-03

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual _____

Número 79.782.747 Btá
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: Leornard PRESTA

Dirección: 901 California Avenue, Palo Alto, CA94304 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/055062

Fecha

Noviembre 2, 2010

Publicación Internacional No. WO 2011/056772

Fecha

Marzo 12, 2011

6

Título (54) ANTICUERPO ANTI-TSLP MODIFICADO POR TÉCNICAS
DE INGENIERIA GENÉTICA

Clasificación Internacional (51) C12P 21/08; C12N 5/07

Prioridad

SI



NO



(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

Noviembre 4, 2009

Enero 21, 2010

(31) Número de Solicitud

61/258.051

61/297.008

9

Comprobante de pago No. 12-

Fecha Abril de 2012



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. 08-084.063



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones. *Bajo la Regla 4.17(ii) del PCT.*



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.



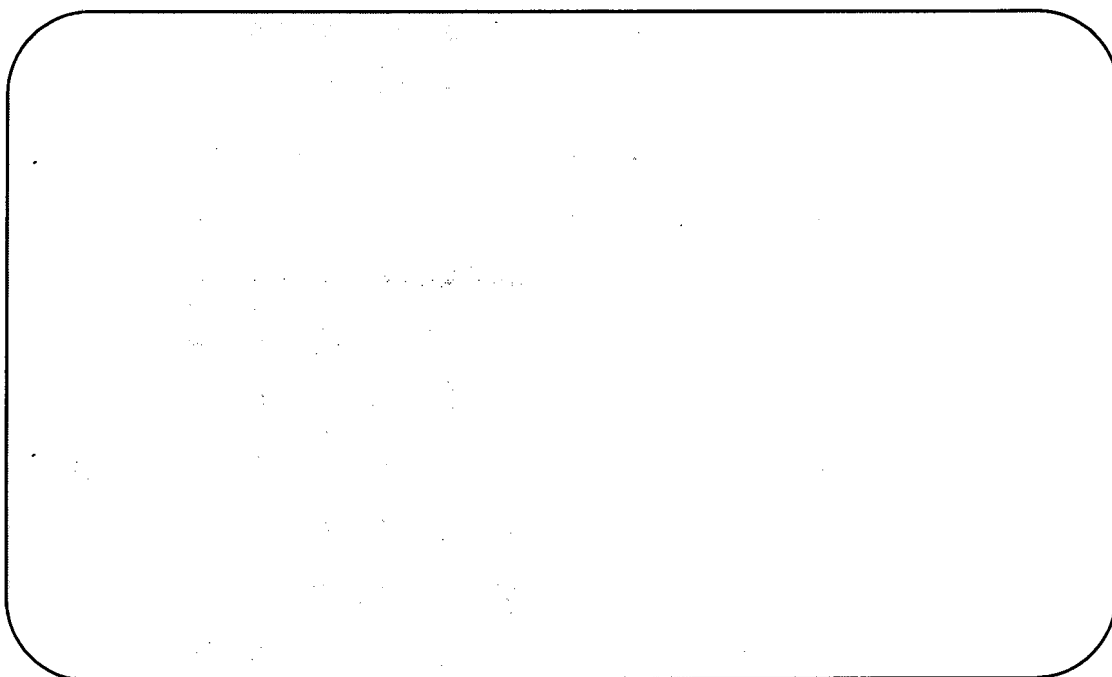
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional

11

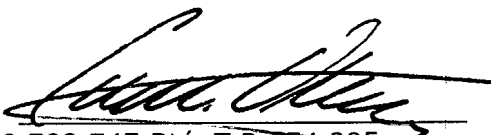
FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 
C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0040905

Bogotá D.C., Abril 26 de 2012 - 10:45:22

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS NI 830.122.870

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	455539792	25/04/2012	5.900.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00
			=====	

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-068980- -00000-0000

Fecha: 2012-04-26 16:42:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 91

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 26 de 2012 - 10:45:23

**APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE
SCHERING CORPORATION**

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
- Este documento Público
2. ha sido firmado por Marguerite La Corte
3. Quien ejerce funciones de Notario público de Nueva Jersey
4. Lleva el sello de Marguerite La Corte Notario

CERTIFICADO

5. En Trenton, Nueva Jersey
6. El 29 de agosto 2003
7. Por John E. McCormac Contador Publico- Tesorero de Nueva Jersey
8. No. A 180345
9. Gran Sello del Estado de Nueva Jersey
10. Firma legible de John M.

PODER DE REPRESENTACIÓN

Bilingüe inglés- español otorgado en Kenilworth, Nueva Jersey, Estados Unidos, el 7 de agosto de 2003 y firmado por Edward H. Mazer - Director Juridico senior.

CERTIFICADO NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, fechado el 7 de agosto, 2003 certificando las funciones de Edward H. Mazer - Director Juridico senior, de Schering Corporation.

Las certificaciones anteriores se basan en el Poder de representación fechado el 4 noviembre de 2002.

Sello: Marguerite La Corte- Notario público,
Estado de Nueva Jersey

Su comisión vence el 7 de octubre de 2003.

Sello en alto relieve del Notario Público

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo, para confrontación. Bogotá 5 septiembre, 2003.

Marlén Neira Castro
MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

5

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MARGUERITE LA CORTE
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MARGUERITE LA CORTE, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 29TH DAY OF AUGUST 2003
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A180345
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



John E McCormac

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,
SCHERING CORPORATION

domiciled in

2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, New Jersey 07033-0532, U.S.A.

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or Ana Maria Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models and Industrial Designs 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, appeals, 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.

Poder

El suscrito,

domiciliado en

New Jersey 07033-0532, U.S.A.

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o Ana Maria Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales 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, apelaciones, 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.

Signature/Firma:


Edward H. Mazer, Senior Legal Director

Date/Fecha:

August 7, 2003

City/Country/Ciudad, País: Kenilworth, New Jersey, U.S.A.

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date, **August 7, 2003**

The undersigned Notary Public certifies:

1. That **Edward H. Mazer**

of legal age and domiciled in

119 Greenwood Drive, Millburn, New Jersey 07041, U.S.A.

signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing document as **Senior Legal Director of SCHERING CORPORATION**

3. That **SCHERING CORPORATION**

having its principal place of business located in

2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, New Jersey 07033-0530, U.S.A.

is duly incorporated, is currently in existence, and

that the purposes for which the Power of Attorney is

granted are within the scope of its corporate

purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):

Power of Attorney, dated November 4, 2002.

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

mayor de edad y domiciliado

119 Greenwood Drive, Millburn, New Jersey 07041, U.S.A.

suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

de

4. Que

con sede principal ubicada en

2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, New Jersey 07033-0530, U.S.A.

está legalmente constituida, que tiene existencia

legal vigente y que los propósitos para los cuales

se otorga el poder se encuentra dentro de los que

comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

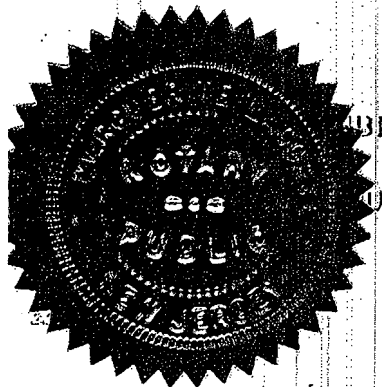
NOTARY PUBLIC (Signature):

Marguerite La Corte

Marguerite La Corte

Notary Public of New Jersey

My Commission Expires October 7, 2003





Box No. VIII (ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT <i>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.</i> 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 this International application Schering Corporation is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following: An assignment from PRESTA, Leonard G. to Schering Corporation, dated 15 October 2010 (15.10.2010) ☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (ii)".

91

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
12 May 2011 (12.05.2011)



(10) International Publication Number
WO 2011/056772 A1

- (51) International Patent Classification:
C12P 21/08 (2006.01) C12N 5/07 (2010.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/055062

(22) International Filing Date:
2 November 2010 (02.11.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/258,051 4 November 2009 (04.11.2009) US
61/297,008 21 January 2010 (21.01.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
SCHERING CORPORATION [US/US]; 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, NJ 07033 (US).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): PRESTA, Leonard, G. [US/US]; 901 California Avenue, Palo Alto, CA 94304 (US).

(74) Agents: TRIOLO, Thomas, A. et al.; Merck, 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, NJ 07033 (US).

(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, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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,

[Continued on next page]

(54) Title: ENGINEERED ANTI-TSLP ANTIBODY

Sequence 1	20	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGTFIPLDTSQY
Sequence 2	1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGTFIPLDTSQY *****
Sequence 1	80	AQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARMGVTHSYVMDAWGGTLTVSS
Sequence 2	61	NQNFKGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARMGVTHSYVMDAWGGTLTVSS * * *****
Sequence 1	140	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
Sequence 2	121	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS *****
Sequence 1	200	GLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHCTPPCPAPELLGG
Sequence 2	181	GLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHCTPPCPAPELLGG *****
Sequence 1	260	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
Sequence 2	241	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN *****
Sequence 1	320	STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
Sequence 2	301	STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTI,PPSRDE *****
Sequence 1	380	LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
Sequence 2	361	LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW *****
Sequence 1	440	QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Sequence 2	421	QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK *****

FIG. 1

[Continued on next page]

WO 2011/056772 A1

GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description (Rules 13bis.4(d)(i) and 48.2(a)(viii))

Declarations under Rule 4.17:

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

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(57) **Abstract:** The invention relates to binding compounds that specifically bind to human TSLP, as well as uses thereof, e.g., in the treatment of inflammatory disorders and allergic inflammatory response.

ENGINEERED ANTI-TSLP ANTIBODY

This application claims the benefit of U.S. provisional patent application no. 61/297,008; filed January 21, 2010; and, U.S. provisional patent application no. 61/258,051; filed November 4, 2009; each of which is herein incorporated by reference in its entirety.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates generally to a thymic stromal lymphopoietin (TSLP) specific antibody, and uses thereof, particularly in inflammatory, and allergic inflammatory disorders.

BACKGROUND OF THE INVENTION

TSLP is an immune cytokine that induces dendritic cell-mediated CD4⁺ T cell responses with a proallergic phenotype DC activated by TSLP play crucial role in the induction and maintenance of allergic inflammatory Th2 and mast cell responses by production of proallergic cytokines, chemokines and costimulatory molecules that direct naïve T cells to become Th2 cells, producing IL-4, IL-5 and IL-13 critical mediators of allergic inflammation. Over-expression of TSLP in Atopic Dermatitis (AtD), Netherton Syndrome and Asthma indicates a crucial, role of this cytokine in the pathogenesis of these allergic inflammatory diseases. This is supported by animal models in which transgenic over-expression of TSLP in skin or lung as well as removal by gene targeting of negative regulators of TSLP results in allergic inflammatory diseases that closely resemble human atopic dermatitis or Asthma. The present invention provides engineered TSLP antibodies and uses thereof to treat inflammatory, and particularly allergic inflammatory disorders, including asthma and atopic dermatitis.

The present invention avoids potential deamidation problems of prior art antibodies. Deamidation of Asn (N) residues is a common degradation of proteins, and it can significantly impact protein structure and function. In antibodies, Asn (N) located in the CDRs can undergo deamidation rapidly and can result in changes in antibody-antigen interactions and therefore represents a serious concern during the development of antibody-based therapeutics. See, e.g., Vlaska et al., *Analytical Biochemistry* 392:145-154 (2009). Thus, it is important to avoid these

potential deamidation problems in antibodies that are intended to be developed for human use. Further, it is important to avoid these problems without changing any of the important characteristics (such as binding affinity) of the antibody.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a binding compound that specifically binds human TSLP, comprising at least one antibody heavy chain variable region, or a TSLP-binding fragment thereof, said heavy chain variable region comprising SEQ ID NO:2

The present invention also provides a binding compound that specifically binds human TSLP comprising at least one antibody heavy chain variable region, or a TSLP-binding fragment thereof, said heavy chain variable region comprising at least SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:1, or SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:3.

The present invention also provides a binding compound that specifically binds human TSLP comprising at least one antibody heavy chain variable region, or a TSLP-binding fragment thereof, said heavy chain variable region comprising SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, and SEQ ID NO:3.

The binding compounds of the invention could further comprise one antibody light chain variable region, or a TSLP-binding fragment thereof. In one embodiment, the antibody light chain variable region, or a TSLP-binding fragment thereof, comprises at least one sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 4, 5 and 6. In another embodiment, the antibody light chain variable region, or TSLP-binding fragment thereof, comprises at least two sequences selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 4, 5 and 6. In other embodiments, the antibody light chain variable region, or TSLP-binding fragment thereof, has the three sequences set forth in SEQ ID NOs: 4, 5 and 6.

In some embodiments of the above described binding compounds, all or substantially all of the remainder of the heavy chain variable region is all or substantially all a human Ig region; and all or substantially all of the remainder of the light chain variable region is all or substantially all a human Ig region. In preferred embodiments, the remainder of the heavy chain variable region is human heavy chain amino acid sequence; and the remainder of the light chain variable region is human light chain amino acid sequence.

The present invention also provides a binding compound that specifically binds human TSLP, comprising: a heavy chain variable region comprising a sequence selected from the group consisting of: (i) SEQ ID NO: 7; (ii) SEQ ID NO:7 or a variant comprising up to 3

modified amino acid residues; and (iii) a sequence having at least 97% homology to SEQ ID NO: 7. In one embodiment, the heavy chain variable region comprises the sequence shown in SEQ ID NO:7. In some embodiments, the binding compound of the invention further comprises a light chain variable region. In one embodiment the light chain variable region comprises a sequence selected from the group consisting of: (i) SEQ ID NO: 8; (ii) SEQ ID NO:8 or a variant comprising up to 3 modified amino acid residues; and (iii) a sequence having at least 97% homology to SEQ ID NO: 8. In one embodiment, the light chain variable region comprises the sequence shown in SEQ ID NO:8.

In a preferred embodiment, the binding compound comprises a heavy chain variable region comprising the sequence shown in SEQ ID NO:7 and a light chain variable region comprising the sequence shown in SEQ ID NO:8.

In some embodiments, the binding compounds of the invention also comprise a heavy chain constant region and/or a light chain constant region. In some embodiment, the heavy chain constant region comprises a $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, or $\gamma 4$ human heavy chain constant region or a variant thereof. In other embodiments the light chain constant region comprises a lambda or a kappa human light chain constant region.

In some embodiments, the binding compound of the invention is an antibody or an antigen binding fragment thereof. In various embodiments the antibody or fragment thereof of the present invention is polyclonal, monoclonal, chimeric, cyno-ized, humanized or fully human. In a preferred embodiment, the antibody is a humanized antibody or a fragment thereof.

The present invention also contemplates that the binding fragment is an antibody fragment selected from the group consisting of Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, and a diabody. The present invention also contemplates that the binding compound is a nanobody, an avimer, or an aptimer.

In one embodiment, the binding compound is an antibody comprising a heavy chain comprising SEQ ID NO:11. In one embodiment, the binding compound comprises a heavy chain comprising SEQ ID NO:11 and a light chain comprising SEQ ID NO:12.

In another preferred embodiment, the binding compound of the invention binds human and cyno TSLP.

In one embodiment, the binding compound of the invention can be expressed from the expression vector deposited under ATCC Deposit No. PTA-10482.

In another embodiment, the binding compound of the invention comprises a heavy chain and a light chain that can be expressed from the expression vector deposited under ATCC Deposit No. PTA-10482. In another embodiment, the binding compound of the invention

comprises a heavy chain variable region and a light chain variable region that can be expressed from the expression vector deposited under ATCC Deposit No. PTA-10482. In another embodiment, the binding compound of the invention comprises the CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 and the CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3 regions of the antibody expressed by the expression vector deposited under ATCC Deposit No. PTA-10482.

In another embodiment, the binding compound of the invention comprises a heavy chain that can be expressed from the expression vector deposited under ATCC Deposit No. PTA-10482. In another embodiment, the binding compound of the invention comprises a heavy chain variable region that can be expressed from the expression vector deposited under ATCC Deposit No. PTA-10482. In another embodiment, the binding compound of the invention comprises the CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 regions of the antibody expressed by the expression vector deposited under ATCC Deposit No. PTA-10482.

The present invention also provides isolated nucleic acids encoding the binding compound of the invention. In one embodiment, the invention comprises a nucleic acid encoding a heavy chain variable region of a binding compound (for example an antibody or antibody fragment) of the invention. In another embodiment, the invention comprises a nucleic acid encoding a binding compound comprising a heavy chain variable region, wherein said heavy chain variable region comprises SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:3. In another embodiment, the invention comprises a nucleic acid encoding SEQ ID NO:7. In another embodiment, the invention comprises a nucleic acid encoding SEQ ID NO:2. In one embodiment, the invention comprises a nucleic acid encoding the heavy chain variable region encoded by the expression vector deposited under ATCC Deposit No. PTA-10482. The invention also provides for expression vectors comprising the nucleic acids of the invention operably linked to control sequences that are recognized by a host cell when the host cell is transfected with the vector. In one embodiment, the invention provides the expression vector deposited under ATCC Deposit No. PTA-10482. Also provided are host cells comprising these expression vectors, and methods of using these expression vectors for producing polypeptides. In one embodiment, the host cell comprises the expression vector deposited under ATCC Deposit No. PTA-10482. The methods of producing polypeptide comprise the steps of: culturing the host cell in culture medium under conditions wherein the nucleic acid sequence is expressed, thereby producing polypeptides comprising the light and heavy chain variable regions; and recovering the polypeptides from the host cell or culture medium. In one embodiment, the invention comprises a method of producing a polypeptide comprising the steps of: culturing a host cell comprising the expression vector deposited under ATCC Deposit No.

PTA-10482 in culture medium under conditions wherein the vector is expressed, thereby producing polypeptides comprising the light and heavy chain variable regions; and recovering the polypeptides from the host cell or culture medium.

The present invention encompasses a method of suppressing an immune response in a human subject comprising administering to a subject in need thereof a binding compound according to the invention that specifically binds human TSLP, in an amount effective to block the biological activity of TSLP. The present invention also contemplates administering an additional immunosuppressive or anti-inflammatory agent. In a preferred embodiment, the immune response is asthma. In another preferred embodiment, the immune response is allergic inflammation. In another preferred embodiment, the allergic inflammation is allergic rhinosinusitis, allergic asthma, allergic conjunctivitis, or atopic dermatitis. In another preferred embodiment, the immune response is fibrosis, inflammatory bowel disease or Hodgkin's lymphoma. In another preferred embodiment, the binding compound is administered in combination with another immunomodulatory agent.

The binding compound the present invention can be in a composition comprising the binding compound of the invention (for example an antibody or a fragment thereof) in combination with a pharmaceutically acceptable carrier or diluent. In a further embodiment, the composition further comprises an immunosuppressive or anti-inflammatory agent.

In various embodiments, the invention relates to medicaments comprising the binding compound (for example an antibody or fragment thereof) of the present invention. For example, the invention encompasses the use of a binding compound that specifically binds human TSLP for the preparation of a medicament to suppress an immune response. The present invention encompasses the use of a binding compound that specifically binds human TSLP (for example, any one of the binding compounds according to the invention) for the preparation of a medicament to treat asthma. The present invention encompasses the use of a binding compound that specifically binds human TSLP for the preparation of a medicament to treat an inflammatory disorder. In one embodiment, the inflammatory disorder is an allergic inflammatory disorder. In one embodiment, the allergic inflammatory disorder is allergic rhinosinusitis, allergic asthma, allergic conjunctivitis, or atopic dermatitis. In a preferred embodiment the allergic inflammatory disorder is allergic asthma. In another preferred embodiment, the allergic inflammatory disorder is atopic dermatitis. For example, the antibodies and fragment of the present invention may be used to treat humans.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURE

Figure 1. Alignment of SEQ ID NO:11 of the instant application against SEQ ID NO:14 of WO2008/076321.

DETAILED DESCRIPTION

As used herein, including the appended claims, the singular forms of words such as “a,” “an,” and “the,” include their corresponding plural references unless the context clearly dictates otherwise. All references cited herein are incorporated by reference to the same extent as if each individual publication, patent application, or patent, was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

I. Definitions

“Activation,” “stimulation,” and “treatment,” as it applies to cells or to receptors, may have the same meaning, e.g., activation, stimulation, or treatment of a cell or receptor with a ligand, unless indicated otherwise by the context or explicitly. “Ligand” encompasses natural and synthetic ligands, e.g., cytokines, cytokine variants, analogues, muteins, and binding compositions derived from antibodies. “Ligand” also encompasses small molecules, e.g., peptide mimetics of cytokines and peptide mimetics of antibodies. “Activation” can refer to cell activation as regulated by internal mechanisms as well as by external or environmental factors. “Response,” e.g., of a cell, tissue, organ, or organism, encompasses a change in biochemical or physiological behavior, e.g., concentration, density, adhesion, or migration within a biological compartment, rate of gene expression, or state of differentiation, where the change is correlated with activation, stimulation, or treatment, or with internal mechanisms such as genetic programming.

“Activity” of a molecule may describe or refer to the binding of the molecule to a ligand or to a receptor, to catalytic activity; to the ability to stimulate gene expression or cell signaling, differentiation, or maturation; to antigenic activity, to the modulation of activities of other molecules, and the like. “Activity” can also mean specific activity, e.g., [catalytic activity]/[mg protein], or [immunological activity]/[mg protein], concentration in a biological compartment, or the like.

“Administration” and “treatment,” as it applies to an animal, human, experimental subject, cell, tissue, organ, or biological fluid, refers to contact of an exogenous pharmaceutical, therapeutic, diagnostic agent, or composition to the animal, human, subject, cell, tissue, organ,

or biological fluid. "Administration" and "treatment" can refer, e.g., to therapeutic, pharmacokinetic, diagnostic, research, and experimental methods. Treatment of a cell encompasses contact of a reagent to the cell, as well as contact of a reagent to a fluid, where the fluid is in contact with the cell. "Administration" and "treatment" also means *in vitro* and *ex vivo* treatments, e.g., of a cell, by a reagent, diagnostic, binding composition, or by another cell. "Treatment," as it applies to a human, veterinary, or research subject, refers to therapeutic treatment, prophylactic or preventative measures, to research and diagnostic applications.

"Binding compound" refers to a molecule that comprises one or more amino acid sequences that specifically bind to human TSLP. In one preferred embodiment, the binding compound is an antibody, preferably an isolated antibody. In another preferred embodiment, the binding compound comprises an antigen-binding fragment of an antibody.

"Binding composition" refers to a TSLP-binding compound in combination with a stabilizer, excipient, salt, buffer, solvent, or additive, capable of binding to a target.

The scope of the present invention also includes complexes comprising any antibody or antigen-binding fragment thereof of the present invention complexed with TSLP polypeptide or an antigenic fragment thereof. Complexes may be prepared by contacting the antibody or fragment with the TSLP polypeptide or antigen fragment.

As used herein, the term "antibody" refers to any form of antibody or fragment thereof that exhibits the desired biological activity. Thus, it is used in the broadest sense and specifically covers monoclonal antibodies (including full length monoclonal antibodies), polyclonal antibodies, multispecific antibodies (e.g., bispecific antibodies), and antibody fragments so long as they exhibit the desired biological activity. "Isolated antibody" refers to the purification status of a binding compound and in such context means the molecule is substantially free of other biological molecules such as nucleic acids, proteins, lipids, carbohydrates, or other material such as cellular debris and growth media. Generally, the term "isolated" is not intended to refer to a complete absence of such material or to an absence of water, buffers, or salts, unless they are present in amounts that substantially interfere with experimental or therapeutic use of the binding compound as described herein.

A "Fab fragment" is comprised of one light chain and the CH1 and variable regions of one heavy chain. The heavy chain of a Fab molecule cannot form a disulfide bond with another heavy chain molecule.

An "Fc" region contains two heavy chain fragments comprising the CH2 and CH3 domains of an antibody. The two heavy chain fragments are held together by two or more disulfide bonds and by hydrophobic interactions of the CH3 domains.

A "Fab' fragment" contains one light chain and a portion or fragment of one heavy chain that contains the VH domain and the CH1 domain and also the region between the CH1 and CH2 domains, such that an interchain disulfide bond can be formed between the two heavy chains of two Fab' fragments to form a F(ab')₂ molecule.

A "F(ab')₂ fragment" contains two light chains and two heavy chains containing a portion of the constant region between the CH1 and CH2 domains, such that an interchain disulfide bond is formed between the two heavy chains. A F(ab')₂ fragment thus is composed of two Fab' fragments that are held together by a disulfide bond between the two heavy chains.

The "Fv region" comprises the variable regions from both the heavy and light chains, but lacks the constant regions.

As used herein, the term "TSLP binding fragment" or "binding fragment thereof" encompasses a fragment or a derivative of an antibody (or another binding substance) that still substantially retain its biological activity of inhibiting TSLP activity. Therefore, the term "antibody fragment" or TSLP binding fragment refers to a portion of a full length antibody, generally the antigen binding or variable region thereof. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies; single-chain antibody molecules, e.g., sc-Fv; domain antibodies; and multispecific antibodies formed from antibody fragments. Typically, a binding fragment or derivative retains at least 10% of its TSLP inhibitory activity. Preferably, a binding fragment or derivative retains at least 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% or 100% (or more) of its TSLP inhibitory activity, although any binding fragment with sufficient affinity to exert the desired biological effect will be useful. It is also intended that a TSLP binding fragment can include conservative amino acid substitutions that do not substantially alter its biologic activity.

The term "monoclonal antibody", as used herein, refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic epitope. In contrast, conventional (polyclonal) antibody preparations typically include a multitude of antibodies directed against (or specific for) different epitopes. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler et al., (1975) *Nature* 256: 495, or may be made by recombinant DNA

methods (*see, e.g.*, U.S. Pat. No. 4,816,567). The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in Clackson et al., (1991) *Nature* 352: 624-628 and Marks et al., (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, for example.

The monoclonal antibodies herein specifically include "chimeric" antibodies (immunoglobulins) in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (U.S. Pat. No. 4,816,567; and Morrison et al., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855).

A "domain antibody" is an immunologically functional immunoglobulin fragment containing only the variable region of a heavy chain or the variable region of a light chain. In some instances, two or more V_H regions are covalently joined with a peptide linker to create a bivalent domain antibody. The two V_H regions of a bivalent domain antibody may target the same or different antigens.

A "bivalent antibody" comprises two antigen binding sites. In some instances, the two binding sites have the same antigen specificities. However, bivalent antibodies may be bispecific.

As used herein, the term "single-chain Fv" or "scFv" antibody refers to antibody fragments comprising the V_H and V_L domains of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Generally, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the V_H and V_L domains which enables the sFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of sFv, see Pluckthun (1994) *THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315.

The monoclonal antibodies herein also include camelized single domain antibodies. *See, e.g.*, Muyldermans et al. (2001) *Trends Biochem. Sci.* 26:230; Reichmann et al. (1999) *J. Immunol. Methods* 231:25; WO 94/04678; WO 94/25591; U.S. Pat. No. 6,005,079, which are hereby incorporated by reference in their entireties). In one embodiment, the present invention provides single domain antibodies comprising two V_H domains with modifications such that single domain antibodies are formed.

As used herein, the term "diabodies" refers to small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a heavy chain variable domain (V_H) connected to a light chain variable domain (V_L) in the same polypeptide chain (V_H - V_L or V_L - V_H). By

using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites. Diabodies are described more fully in, *e.g.*, EP 404,097; WO 93/11161; and Holliger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448. For a review of engineered antibody variants generally see Holliger and Hudson (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1126-1136.

As used herein, the term "humanized antibody" refers to forms of antibodies that contain sequences from non-human (*e.g.*, murine) antibodies as well as human antibodies. Such antibodies contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optionally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. The prefix "h", "hu" or "hum" is added to antibody clone designations when necessary to distinguish humanized antibodies (*e.g.*, "hu23B12") from parental rodent antibodies (*e.g.*, rat 23B12, or "r23B12"). The humanized forms of rodent antibodies will generally comprise the same CDR sequences of the parental rodent antibodies, although certain amino acid substitutions may be included to increase affinity or increase stability of the humanized antibody.

The antibodies of the present invention also include antibodies with modified (or blocked) Fc regions to provide altered effector functions. See, *e.g.*, U.S. Pat. No. 5,624,821; WO2003/086310; WO2005/120571; WO2006/0057702; Presta (2006) *Adv. Drug Delivery Rev.* 58:640-656. Such modification can be used to enhance or suppress various reactions of the immune system, with possible beneficial effects in diagnosis and therapy. Alterations of the Fc region include amino acid changes (substitutions, deletions and insertions), glycosylation or deglycosylation, and adding multiple Fc. Changes to the Fc can also alter the half-life of antibodies in therapeutic antibodies, and a longer half-life would result in less frequent dosing, with the concomitant increased convenience and decreased use of material. See Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731 at 734-35.

The term "fully human antibody" refers to an antibody that comprises human immunoglobulin protein sequences only. A fully human antibody may contain murine carbohydrate chains if produced in a mouse, in a mouse cell, or in a hybridoma derived from a

mouse cell. Similarly, “mouse antibody” refers to an antibody which comprises mouse immunoglobulin sequences only.

As used herein, the term "hypervariable region" refers to the amino acid residues of an antibody that are responsible for antigen-binding. The hypervariable region comprises amino acid residues from a "complementarity determining region" or "CDR" (e.g. residues 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) and 89-97 (CDRL3) in the light chain variable domain and residues 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) and 95-102 (CDRH3) in the heavy chain variable domain; Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) and/or those residues from a "hypervariable loop" (i.e. residues 26-32 (L1), 50-52 (L2) and 91-96 (L3) in the light chain variable domain and 26-32 (H1), 53-55 (H2) and 96-101 (H3) in the heavy chain variable domain; Chothia and Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917). As used herein, the term "framework" or "FR" residues refers to those variable domain residues other than the hypervariable region residues defined herein as CDR residues. The residue numbering above relates to the Kabat numbering system and does not necessarily correspond in detail to the sequence numbering in the accompanying Sequence Listing.

“Binding” refers to an association of the binding composition with a target where the association results in reduction in the normal Brownian motion of the binding composition, in cases where the binding composition can be dissolved or suspended in solution.

“Conservatively modified variants” or “conservative substitution” refers to substitutions of amino acids are known to those of skill in this art and may be made generally without altering the biological activity of the resulting molecule. Those of skill in this art recognize that, in general, single amino acid substitutions in non-essential regions of a polypeptide do not substantially alter biological activity (see, e.g., Watson, et al., *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Edition 1987)). Such exemplary substitutions are preferably made in accordance with those set forth in Table 1 as follows:

Table 1
Exemplary Conservative Amino Acid Substitutions

Original residue	Conservative substitution
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala

Original residue	Conservative substitution
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

"Effective amount" encompasses an amount sufficient to ameliorate or prevent a symptom or sign of the medical condition. Effective amount also means an amount sufficient to allow or facilitate diagnosis. An effective amount for a particular patient or veterinary subject may vary depending on factors such as the condition being treated, the overall health of the patient, the method route and dose of administration and the severity of side affects (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,888,530 issued to Netti, *et al.*). An effective amount can be the maximal dose or dosing protocol that avoids significant side effects or toxic effects. The effect will result in an improvement of a diagnostic measure or parameter by at least 5%, usually by at least 10%, more usually at least 20%, most usually at least 30%, preferably at least 40%, more preferably at least 50%, most preferably at least 60%, ideally at least 70%, more ideally at least 80%, and most ideally at least 90%, where 100% is defined as the diagnostic parameter shown by a normal subject (see, e.g., Maynard, *et al.* (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., London, UK).

As used herein, the term "isolated nucleic acid molecule" refers to a nucleic acid molecule that is identified and separated from at least one contaminant nucleic acid molecule with which it is ordinarily associated in the natural source of the antibody nucleic acid. An isolated nucleic acid molecule is other than in the form or setting in which it is found in nature. Isolated nucleic acid molecules therefore are distinguished from the nucleic acid molecule as it

exists in natural cells. However, an isolated nucleic acid molecule includes a nucleic acid molecule contained in cells that ordinarily express the antibody where, for example, the nucleic acid molecule is in a chromosomal location different from that of natural cells.

The expression "control sequences" refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, polyadenylation signals, and enhancers.

A nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

As used herein, the expressions "cell," "cell line," and "cell culture" are used interchangeably and all such designations include progeny. Thus, the words "transformants" and "transformed cells" include the primary subject cell and cultures derived therefrom without regard for the number of transfers. It is also understood that all progeny may not be precisely identical in DNA content, due to deliberate or inadvertent mutations. Mutant progeny that have the same function or biological activity as screened for in the originally transformed cell are included. Where distinct designations are intended, it will be clear from the context.

As used herein, "polymerase chain reaction" or "PCR" refers to a procedure or technique in which minute amounts of a specific piece of nucleic acid, RNA and/or DNA, are amplified as described in, *e.g.*, U.S. Pat. No. 4,683,195. Generally, sequence information from the ends of the region of interest or beyond needs to be available, such that oligonucleotide primers can be designed; these primers will be identical or similar in sequence to opposite strands of the template to be amplified. The 5' terminal nucleotides of the two primers can coincide with the ends of the amplified material. PCR can be used to amplify specific RNA sequences, specific DNA sequences from total genomic DNA, and cDNA transcribed from total cellular RNA, bacteriophage or plasmid sequences, etc. *See generally* Mullis et al. (1987) *Cold Spring Harbor*

Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich, ed., (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.) As used herein, PCR is considered to be one, but not the only, example of a nucleic acid polymerase reaction method for amplifying a nucleic acid test sample comprising the use of a known nucleic acid as a primer and a nucleic acid polymerase to amplify or generate a specific piece of nucleic acid.

As used herein, the term “germline sequence” refers to a sequence of unarranged immunoglobulin DNA sequences. Any suitable source of unarranged immunoglobulin DNA may be used.

“Inhibitors” are compounds that decrease, block, prevent, delay activation, inactivate, desensitize, or down regulate, e.g., a gene, protein, ligand, receptor, or cell. An inhibitor may also be defined as a composition that reduces, blocks, or inactivates a constitutive activity. An “antagonist” is a compound that opposes the actions of an agonist. An antagonist prevents, reduces, inhibits, or neutralizes the activity of an agonist. An antagonist can also prevent, inhibit, or reduce constitutive activity of a target, e.g., a target receptor, even where there is no identified agonist.

To examine the extent of inhibition, for example, samples or assays comprising a given, e.g., protein, gene, cell, or organism, are treated with a potential activating or inhibiting agent and are compared to control samples without the agent. Control samples, i.e., not treated with agent, are assigned a relative activity value of 100%. Inhibition is achieved when the activity value relative to the control is about 90% or less, typically 85% or less, more typically 80% or less, most typically 75% or less, generally 70% or less, more generally 65% or less, most generally 60% or less, typically 55% or less, usually 50% or less, more usually 45% or less, most usually 40% or less, preferably 35% or less, more preferably 30% or less, still more preferably 25% or less, and most preferably less than 25%.

Endpoints in inhibition can be monitored as follows. Inhibition, and response to treatment, e.g., of a cell, physiological fluid, tissue, organ, and animal or human subject, can be monitored by an endpoint. The endpoint may comprise a predetermined quantity or percentage of, e.g., an indicia of inflammation, oncogenicity, or cell degranulation or secretion, such as the release of a cytokine, toxic oxygen, or a protease. The endpoint may comprise, e.g., a predetermined quantity of ion flux or transport; cell migration; cell adhesion; cell proliferation; potential for metastasis; cell differentiation; and change in phenotype, e.g., change in expression of gene relating to inflammation, apoptosis, transformation, cell cycle, or metastasis (see, e.g., Knight (2000) *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30:145-158; Hood and Cheresch (2002) *Nature Rev. Cancer* 2:91-100; Timme, *et al.* (2003) *Curr. Drug Targets* 4:251-261; Robbins and Itzkowitz (2002)

19

Med. Clin. North Am. 86:1467-1495; Grady and Markowitz (2002) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3:101-128; Bauer, *et al.* (2001) *Glia* 36:235-243; Stanimirovic and Satoh (2000) *Brain Pathol.* 10:113-126).

An endpoint of inhibition is generally 75% of the control or less, preferably 50% of the control or less, more preferably 25% of the control or less, and most preferably 10% of the control or less. Generally, an endpoint of activation is at least 150% the control, preferably at least two times the control, more preferably at least four times the control, and most preferably at least 10 times the control.

"Specifically" or "selectively" binds, when referring to a ligand/receptor, antibody/antigen, or other binding pair, indicates a binding reaction which is determinative of the presence of the protein, *e.g.*, TSLP, in a heterogeneous population of proteins and/or other biologics. Thus, under designated conditions, a specified ligand/antigen binds to a particular receptor/antibody and does not bind in a significant amount to other proteins present in the sample.

The antibody, or binding composition derived from the antigen-binding site of an antibody, of the contemplated method binds to its antigen with an affinity that is at least ten times greater, more preferably at least 20-times greater, and most preferably at least 50-times greater than the affinity with unrelated antigens. In a preferred embodiment the antibody will have an affinity that is greater than about 10^9 liters/mol, as determined, *e.g.*, by Scatchard analysis (Munsen, *et al.* (1980) *Analyt. Biochem.* 107:220-239).

As used herein, the term "inflammatory disorder" refers to any disease or disorder characterized by local inflammation at a site of injury or infection and includes, without limitation, allergic inflammation, autoimmune diseases, and other disorders characterized by undesired immune cell accumulation at a local tissue site.

As used herein, the term "immunomodulatory agent" refers to natural or synthetic agents that suppress or modulate an immune response. The immune response can be a humoral or cellular response. Immunomodulatory agents encompass immunosuppressive or anti-inflammatory agents.

"Immunosuppressive agents," "immunosuppressive drugs," or "immunosuppressants" as used herein are therapeutics that are used in immunosuppressive therapy to inhibit or prevent activity of the immune system. Clinically they are used to prevent the rejection of transplanted organs and tissues (*e.g.* bone marrow, heart, kidney, liver), and/or in the treatment of autoimmune diseases or diseases that are most likely of autoimmune origin (*e.g.* rheumatoid arthritis, myasthenia gravis, systemic lupus erythematosus, ulcerative colitis, multiple sclerosis).

Immunosuppressive drugs can be classified into four groups: glucocorticoids; cytostatics; antibodies (including Biological Response Modifiers or DMARDs); drugs acting on immunophilins; other drugs, including known chemotherapeutic agents used in the treatment of proliferative disorders. For multiple sclerosis, in particular, the antibodies of the present invention can be administered in conjunction with a new class of myelin binding protein-like therapeutics, known as copaxones.

“Anti-inflammatory agents” or “anti-inflammatory drugs”, is used to represent both steroidal and non-steroidal therapeutics. Steroids, also known as corticosteroids, are drugs that closely resemble cortisol, a hormone produced naturally by adrenal glands. Steroids are used as the main treatment for certain inflammatory conditions, such as: Systemic vasculitis (inflammation of blood vessels); and Myositis (inflammation of muscle). Steroids might also be used selectively to treat inflammatory conditions such as: rheumatoid arthritis (chronic inflammatory arthritis occurring in joints on both sides of the body); systemic lupus erythematosus (a generalized disease caused by abnormal immune system function); Sjögren's syndrome (chronic disorder that causes dry eyes and a dry mouth).

Non-steroidal anti-inflammatory drugs, usually abbreviated to NSAIDs, are drugs with analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects - they reduce pain, fever and inflammation. The term "non-steroidal" is used to distinguish these drugs from steroids, which (amongst a broad range of other effects) have a similar eicosanoid-depressing, anti-inflammatory action. NSAIDs are generally indicated for the symptomatic relief of the following conditions: rheumatoid arthritis; osteoarthritis; inflammatory arthropathies (e.g. ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, Reiter's syndrome); acute gout ; dysmenorrhoea; metastatic bone pain; headache and migraine; postoperative pain ; mild-to-moderate pain due to inflammation and tissue injury; pyrexia; and renal colic. NSAIDs include salicylates, arylalkanoic acids, 2-arylpropionic acids (profens), N-arylanthranilic acids (fenamic acids), oxicams, coxibs (selective COX-2 inhibitors), sulphonanilides, diclofenac, diflunisal, etodolac, fenoprofen, flurbiprofen, ibuprofen, indomethacin, ketoprofen, ketorolac, mefenamic acid, meloxicam, nabumetone, naproxen, oxaprozin, piroxicam, salsalate, sulindac or tolmetin

II. General

The present invention provides engineered anti-TSLP antibodies and uses thereof to treat inflammatory, and particularly allergic inflammatory, disorders. In a preferred embodiment, the inflammatory disorder is asthma. In a preferred embodiment, the allergic inflammatory disorder is allergic rhinosinusitis, allergic asthma, allergic conjunctivitis, or atopic

18

dermatitis. The present invention also provides engineered anti-TSLP antibodies to treat fibrosis, inflammatory bowel disease or Hodgkin's lymphoma.

As used herein, the term "TSLP" includes variants, isoforms, homologs, orthologs and paralogs of TSLP. The amino acid sequence of human TSLP is set forth in SEQ ID NO:4 of International Publication No. WO00/17362.

III. Engineered TSLP Specific Antibodies of the Invention

The invention relates to engineered anti-TSLP antibodies comprising specified CDR regions.

Methods for recombinantly engineering antibodies have been described, *e.g.*, by Boss et al. (U.S. Pat. No. 4,816,397), Cabilly et al. (U.S. Pat. No. 4,816,567), Law et al. (European Patent Application Publication No. 438 310) and Winter (European Patent Application Publication No. 239400).

Engineered antibodies of the invention include those in which modifications have been made to framework residues within VH and/or VL, *e.g.* to improve the properties of the antibody. Typically such framework modifications are made to decrease the immunogenicity of the antibody. For example, one approach is to "backmutate" one or more framework residues to the corresponding germline sequence. More specifically, an antibody that has undergone somatic mutation can contain framework residues that differ from the germline sequence from which the antibody is derived. Such residues can be identified by comparing the antibody framework sequences to the germline sequences from which the antibody is derived.

Another type of framework modification involves mutating one or more residues within the framework region, or even within one or more CDR regions, to remove T cell epitopes to thereby reduce the potential immunogenicity of the antibody. This approach is also referred to as "deimmunization" and is described in further detail in U.S. Patent Publication No. 20030153043.

In addition or alternative to modifications made within the framework or CDR regions, antibodies of the invention can be engineered to include modifications within the Fc region, typically to alter one or more functional properties of the antibody, such as serum half-life, complement fixation, Fc receptor binding, and/or antigen-dependent cellular cytotoxicity. Furthermore, an antibody of the invention can be chemically modified (*e.g.*, one or more chemical moieties can be attached to the antibody) or be modified to alter its glycosylation, again to alter one or more functional properties of the antibody. Each of these embodiments is

described in further detail below. The numbering of residues in the Fc region is that of the EU index of Kabat.

In one embodiment, the antibody is an IgG4 isotype antibody comprising a Serine to Proline mutation at a position corresponding to position 228 (S228P; EU index) in the hinge region of the heavy chain constant region. This mutation has been reported to abolish the heterogeneity of inter-heavy chain disulfide bridges in the hinge region (Angal et al. *supra*; position 241 is based on the Kabat numbering system).

In one embodiment, the hinge region of CH1 is modified such that the number of cysteine residues in the hinge region is altered, e.g., increased or decreased. This approach is described further in U.S. Patent No. 5,677,425. The number of cysteine residues in the hinge region of CH1 is altered to, for example, facilitate assembly of the light and heavy chains or to increase or decrease the stability of the antibody.

In another embodiment, the Fc hinge region of an antibody is mutated to decrease the biological half life of the antibody. More specifically, one or more amino acid mutations are introduced into the CH2-CH3 domain interface region of the Fc-hinge fragment such that the antibody has impaired Staphylococcal protein A (SpA) binding relative to native Fc-hinge domain SpA binding. This approach is described in further detail in U.S. Patent No. 6,165,745.

In another embodiment, the antibody is modified to increase its biological half life. Various approaches are possible. For example, one or more of the following mutations can be introduced: T252L, T254S, T256F, as described in U.S. Patent No. 6,277,375. Alternatively, to increase the biological half life, the antibody can be altered within the CH1 or CL region to contain a salvage receptor binding epitope taken from two loops of a CH2 domain of an Fc region of an IgG, as described in U.S. Patent Nos. 5,869,046 and 6,121,022.

In yet other embodiments, the Fc region is altered by replacing at least one amino acid residue with a different amino acid residue to alter the effector function(s) of the antibody. For example, one or more amino acids selected from amino acid residues 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 and 322 can be replaced with a different amino acid residue such that the antibody has an altered affinity for an effector ligand but retains the antigen-binding ability of the parent antibody. The effector ligand to which affinity is altered can be, for example, an Fc receptor or the C1 component of complement. This approach is described in further detail in U.S. Patent Nos. 5,624,821 and 5,648,260.

In another example, one or more amino acids selected from amino acid residues 329, 331 and 322 can be replaced with a different amino acid residue such that the antibody has

altered C1q binding and/or reduced or abolished complement dependent cytotoxicity (CDC). This approach is described in further detail in U.S. Patent No. 6,194,551.

In another example, one or more amino acid residues within amino acid positions 231 and 239 are altered to thereby alter the ability of the antibody to fix complement. This approach is described further in PCT Publication WO 94/29351.

In yet another example, the Fc region is modified to increase the ability of the antibody to mediate antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and/or to increase the affinity of the antibody for an Fcγ receptor by modifying one or more amino acids at the following positions: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 or 439. This approach is described further in PCT Publication WO 00/42072. Moreover, the binding sites on human IgG1 for FcγR1, FcγR2, FcγR3 and FcRn have been mapped and variants with improved binding have been described (see Shields et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Specific mutations at positions 256, 290, 298, 333, 334 and 339 were shown to improve binding to FcγR3. Additionally, the following combination mutants were shown to improve FcγR3 binding: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A and S298A/E333A/K334A.

In still another embodiment, the glycosylation of an antibody is modified or altered, to delete or add carbohydrate moieties to the antibodies. For example, an aglycosylated antibody can be made (i.e., the antibody lacks glycosylation). Glycosylation can be altered to, for example, increase the affinity of the antibody for antigen. Such carbohydrate modifications can be accomplished by, for example, altering one or more sites of glycosylation within the antibody sequence. For example, one or more amino acid substitutions can be made that result in elimination of one or more variable region framework glycosylation sites to thereby eliminate glycosylation at that site. Such aglycosylation may increase the affinity of the antibody for antigen. See, e.g., U.S. Patent Nos. 5,714,350 and 6,350,861.

Additionally or alternatively, an antibody can be made that has an altered type of glycosylation, such as a hypofucosylated antibody having reduced amounts of fucosyl residues or an antibody having increased bisecting GlcNac structures. Such altered glycosylation patterns have been demonstrated to increase the ADCC ability of antibodies. Such carbohydrate modifications can be accomplished by, for example, expressing the antibody in a host cell with altered glycosylation machinery. Cells with altered glycosylation machinery have been described in the art and can be used as host cells in which to express recombinant antibodies of

the invention to thereby produce an antibody with altered glycosylation. For example, the cell lines Ms704, Ms705, and Ms709 lack the fucosyltransferase gene, FUT8 (α (1,6)-fucosyltransferase), such that antibodies expressed in the Ms704, Ms705, and Ms709 cell lines lack fucose on their carbohydrates. The Ms704, Ms705, and Ms709 FUT8^{-/-} cell lines were created by the targeted disruption of the FUT8 gene in CHO/DG44 cells using two replacement vectors (see U.S. Patent Publication No. 20040110704 and Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). As another example, EP 1,176,195 describes a cell line with a functionally disrupted FUT8 gene, which encodes a fucosyl transferase, such that antibodies expressed in such a cell line exhibit hypofucosylation by reducing or eliminating the α -1,6 bond-related enzyme. EP 1,176,195 also describes cell lines which have a low enzyme activity for adding fucose to the N-acetylglucosamine that binds to the Fc region of the antibody or does not have the enzyme activity, for example the rat myeloma cell line YB2/0 (ATCC CRL 1662). PCT Publication WO 03/035835 describes a variant CHO cell line, Lec13 cells, with reduced ability to attach fucose to Asn(297)-linked carbohydrates, also resulting in hypofucosylation of antibodies expressed in that host cell (see also Shields et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Antibodies with a modified glycosylation profile can also be produced in chicken eggs, as described in PCT Publication WO 06/089231. Alternatively, antibodies with a modified glycosylation profile can be produced in plant cells, such as *Lemna*. PCT Publication WO 99/54342 describes cell lines engineered to express glycoprotein-modifying glycosyl transferases (e.g., β (1,4)-N-acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII)) such that antibodies expressed in the engineered cell lines exhibit increased bisecting GlcNAc structures which results in increased ADCC activity of the antibodies (see also Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Alternatively, the fucose residues of the antibody can be cleaved off using a fucosidase enzyme; e.g., the fucosidase α -L-fucosidase removes fucosyl residues from antibodies (Tarentino et al. (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Another modification of the antibodies herein that is contemplated by this disclosure is pegylation. An antibody can be pegylated to, for example, increase the biological (e.g., serum) half life of the antibody. To pegylate an antibody, the antibody, or fragment thereof, typically is reacted with polyethylene glycol (PEG), such as a reactive ester or aldehyde derivative of PEG, under conditions in which one or more PEG groups become attached to the antibody or antibody fragment. Preferably, the pegylation is carried out via an acylation reaction or an alkylation reaction with a reactive PEG molecule (or an analogous reactive water-soluble polymer). As used herein, the term "polyethylene glycol" is intended to encompass any of the forms of PEG that have been used to derivatize other proteins, such as mono (C1-C10) alkoxy- or aryloxy-

polyethylene glycol or polyethylene glycol-maleimide. In certain embodiments, the antibody to be pegylated is an aglycosylated antibody. Methods for pegylating proteins are known in the art and can be applied to the antibodies of the invention. See, e.g., EP 0 154 316 and EP 0 401 384.

Amino acid sequence variants of humanized anti-TSLP antibody of the invention can be prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the humanized anti-TSLP antibody DNA, or by peptide synthesis. Such variants include, for example, deletions from, and/or insertions into and/or substitutions of, residues within the amino acid sequences shown for the humanized anti-TSLP antibodies disclosed and claimed herein. Any combination of deletion, insertion, and substitution can be made to arrive at the final construct, provided that the final construct possesses the desired characteristics. As discussed above, the amino acid changes also may alter post-translational processes of the humanized anti-TSLP antibody, such as changing the number or position of glycosylation sites.

A useful method for identification of certain residues or regions of the humanized anti-TSLP antibody polypeptide that are preferred locations for mutagenesis is called "alanine scanning mutagenesis," as described by Cunningham and Wells (1989) *Science* 244: 1081-1085. Here, a residue or group of target residues are identified (e.g., charged residues such as Arg, Asp, His, Lys, and Glu) and replaced by a neutral or negatively charged amino acid (most preferably alanine or polyalanine) to affect the interaction of the amino acids with TSLP antigen. The amino acid residues demonstrating functional sensitivity to the substitutions then are refined by introducing further or other variants at, or for, the sites of substitution. Thus, while the site for introducing an amino acid sequence variation is predetermined, the nature of the mutation *per se* need not be predetermined. For example, to analyze the performance of a mutation at a given site, Ala scanning or random mutagenesis is conducted at the target codon or region and the expressed humanized anti-TSLP antibody variants are screened for the desired activity.

Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include humanized anti-TSLP antibody with an N-terminal methionyl residue or the antibody fused to an epitope tag. Other insertional variants of the humanized anti-TSLP antibody molecule include the fusion to the N- or C-terminus of humanized anti-TSLP antibody of an enzyme or a polypeptide which increases the serum half-life of the antibody.

Another type of variant is an amino acid substitution variant. These variants have at least one amino acid residue in the humanized anti-TSLP antibody molecule removed and a different residue inserted in its place. The sites of greatest interest for substitutional mutagenesis include the hypervariable loops, but FR alterations are also contemplated. Hypervariable region residues or FR residues involved in antigen binding are generally substituted in a relatively conservative manner.

Yet another type of amino acid variant is the substitution of residues to provide for greater chemical stability of the final humanized antibody.

In certain embodiments, it will be desirable to change certain amino acids containing exposed side-chains to another amino acid residue in order to provide for greater chemical stability of the final antibody, as follows. For example, an asparagine (Asn) residue may be changed to Gln or Ala to reduce the potential for formation of isoaspartate at any Asn-Gly sequences within a CDR. A similar problem may occur at a Asp-Gly sequence. Reissner and Aswad (2003) *Cell. Mol. Life Sci.* 60:1281. Isoaspartate formation may debilitate or completely abrogate binding of an antibody to its target antigen. See, Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731 at 734. In one embodiment, the asparagine is changed to glutamine (Gln). It may also be desirable to alter an amino acid adjacent to an asparagine (Asn) or glutamine (Gln) residue to reduce the likelihood of deamidation, which occurs at greater rates when small amino acids occur adjacent to asparagine or glutamine. See, Bischoff & Kolbe (1994) *J. Chromatog.* 662:261. In addition, any methionine residues (typically solvent exposed Met) in CDRs may be changed to Lys, Leu, Ala, or Phe in order to reduce the possibility that the methionine sulfur would oxidize, which could reduce antigen binding affinity and also contribute to molecular heterogeneity in the final antibody preparation. *Id.* In one embodiment, the methionine is changed to alanine (Ala). Additionally, in order to prevent or minimize potential scissile Asn-Pro peptide bonds, it may be desirable to alter any Asn-Pro combinations found in a CDR to Gln-Pro, Ala-Pro, or Asn-Ala. Antibodies with such substitutions are subsequently screened to ensure that the substitutions do not decrease TSLP binding affinity or other desired biological activity to unacceptable levels.

2

TABLE 2
Exemplary stabilizing CDR variants

CDR Residue	Stabilizing Variant Sequence
Asn-Gly (N-G)	Gln-Gly, Ala-Gly, or Asn-Ala (Q-G), (A-G), or (N-A)
Asp-Gly (D-G)	Glu-Gly, Ala-Gly or Asp-Ala (E-G), (A-G), or (D-A)
Met (typically solvent exposed) (M)	Lys, Leu, Ala, or Phe (K), (L), (A), or (F)
Asn (N)	Gln or Ala (Q) or (A)
Asn-Pro (N-P)	Gln-Pro, Ala-Pro, or Asn-Ala (Q-P), (A-P), or (N-A)

In addition, methionine residues in rodent CDRs may be changed to reduce the possibility that the methionine sulfur would oxidize, which could reduce antigen binding affinity and also contribute to molecular heterogeneity in the final antibody preparation. *Id.* In one embodiment, the methionine is changed to alanine (A). Antibodies with such substitutions are subsequently screened to ensure that the substitutions do not decrease TSLP binding affinity to unacceptable levels.

Nucleic acid molecules encoding amino acid sequence variants of humanized TSLP specific antibody are prepared by a variety of methods known in the art. These methods include, but are not limited to, isolation from a natural source (in the case of naturally occurring amino acid sequence variants) or preparation by oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis, and cassette mutagenesis of an earlier prepared variant or a non-variant version of humanized anti-TSLP antibody.

Ordinarily, amino acid sequence variants of the humanized anti-TSLP antibody will have an amino acid sequence having at least 97% amino acid sequence identity with the original humanized antibody amino acid sequences of either the heavy or the light chain more preferably at least 98%, more preferably at least 99%. Identity or homology with respect to this sequence is defined herein as the percentage of amino acid residues in the candidate sequence that are identical with the humanized anti-TSLP residues, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. None of N-terminal, C-terminal, or internal extensions, deletions, or insertions into the antibody sequence shall be construed as affecting sequence identity or homology.

The humanized antibody can be selected from any class of immunoglobulins, including IgM, IgG, IgD, IgA, and IgE. Preferably, the antibody is an IgG antibody. Any isotype of IgG can be used, including IgG₁, IgG₂, IgG₃, and IgG₄. Variants of the IgG isotypes are also contemplated. The humanized antibody may comprise sequences from more than one class or isotype. Optimization of the necessary constant domain sequences to generate the desired biologic activity is readily achieved by screening the antibodies in the biological assays described below.

Likewise, either class of light chain can be used in the compositions and methods herein. Specifically, kappa, lambda, or variants thereof are useful in the present compositions and methods.

Any suitable portion of the CDR sequences from the non-human antibody can be used. The CDR sequences can be mutagenized by substitution, insertion or deletion of at least one residue such that the CDR sequence is distinct from the human and non-human antibody sequence employed. It is contemplated that such mutations would be minimal. Typically, at least 95% of the humanized antibody residues will correspond to those of the non-human CDR residues, and most preferably greater than 97%.

Any suitable portion of the FR sequences from the human antibody can be used. The FR sequences can be mutagenized by substitution, insertion or deletion of at least one residue such that the FR sequence is distinct from the human and non-human antibody sequence employed. It is contemplated that such mutations would be minimal. Typically, at least 75% of the humanized antibody residues will correspond to those of the human FR residues, more often 90%, and most preferably greater than 95%.

CDR and FR residues are determined according to the standard sequence definition of Kabat. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda Md. (1987).

In a preferred embodiment, a binding composition according to the invention comprises, one or more of the following sequences:

- The CDR-H1 sequence GYIFTDYAMH (SEQ ID NO: 1).
- The CDR-H2 sequence TFIPLDTSFYAQKFQG (SEQ ID NO: 2).
- The CDR-H3 sequence MGVTHSYVMDA (SEQ ID NO: 3).
- The CDR-L1 sequence RASQPISISVH (SEQ ID NO: 4).
- The CDR-L2 sequence FASQSI (SEQ ID NO: 5).
- The CDR-L3 sequence QQTFSLPYT (SEQ ID NO: 6).
- The variable heavy chain amino acid sequence shown in SEQ ID NO:7.

- The variable light chain amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 8.
- The nucleic acid sequence encoding the variable heavy chain shown in SEQ ID NO:9.
- The nucleic acid sequence encoding the variable light chain shown in SEQ ID NO:10.
- The heavy chain amino acid sequence shown in SEQ ID NO:11. This sequence can further comprise the following leader sequence: MAVLGLLFCLVTFPSCVLS (SEQ ID NO:15).
- The light chain amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 12. This sequence can further comprise the following leader sequence: MAPVQLLGLLVFLPAMRC (SEQ ID NO:16).
- The nucleic acid sequence encoding the heavy chain is shown in SEQ ID NO:13. This sequence can further comprise a sequence encoding a leader sequence, preferably the following leader sequence: MAVLGLLFCLVTFPSCVLS (SEQ ID NO:15).
- The nucleic acid sequence encoding the light chain is shown in SEQ ID NO:14. This sequence can further comprise a sequence encoding a leader sequence, preferably the following leader sequence: MAPVQLLGLLVFLPAMRC (SEQ ID NO:16).

For example, the present invention includes an isolated antibody or antigen-binding fragment thereof comprising a light chain immunoglobulin comprising CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3 (as set forth above) and a heavy chain immunoglobulin comprising CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 (as set forth above). The present invention also includes an isolated antibody or antigen-binding fragment thereof comprising a light chain immunoglobulin variable region comprising the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 8 or 12 and a heavy chain immunoglobulin variable region comprising the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 7 and 11 (*e.g.*, SEQ ID NO: 7 paired with SEQ ID NO: 8; or, SEQ ID NO: 11 paired with SEQ ID NO: 12). Such an antibody or fragment can, in an embodiment of the invention, be linked to an immunoglobulin constant domain such as IgG (*e.g.*, IgG₁, IgG₂, IgG₃ or IgG₄). A pharmaceutical composition thereof, comprising said antibody or fragment and a pharmaceutically acceptable carrier, is also part of the present invention.

In some embodiments, different constant domains may be appended to the humanized V_L and V_H regions provided herein. For example, if a particular intended use of an antibody (or fragment) of the present invention were to call for altered effector functions, a heavy chain

constant domain other than IgG1 may be used. Although IgG1 antibodies provide for long half-life and for effector functions, such as complement activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity, such activities may not be desirable for all uses of the antibody. In such instances an IgG4 constant domain, for example, may be used.

IV. Antibody Conjugates

The binding compounds of the invention, for example the antibody or antibody fragments of the invention, may also be conjugated to a chemical moiety. The chemical moiety may be, *inter alia*, a polymer, a radionuclide or a cytotoxic factor. Preferably the chemical moiety is a polymer which increases the half-life of the antibody molecule in the body of a subject. Suitable polymers include, but are not limited to, polyethylene glycol (PEG) (*e.g.*, PEG with a molecular weight of 2kDa, 5 kDa, 10 kDa, 12kDa, 20 kDa, 30kDa or 40kDa), dextran and monomethoxypolyethylene glycol (mPEG). Lee, *et al.*, (1999) (*Bioconj. Chem.* 10:973-981) discloses PEG conjugated single-chain antibodies. Wen, *et al.*, (2001) (*Bioconj. Chem.* 12:545-553) disclose conjugating antibodies with PEG which is attached to a radiometal chelator (diethylenetriaminopentaacetic acid (DTPA)).

The antibodies and antibody fragments of the invention may also be conjugated with labels such as ^{99}Tc , ^{90}Y , ^{111}In , ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , ^{131}I , ^{11}C , ^{15}O , ^{13}N , ^{18}F , ^{35}S , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{226}Ra , ^{60}Co , ^{59}Fe , ^{57}Se , ^{152}Eu , ^{67}Cu , ^{217}Cl , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd , ^{234}Th , and ^{40}K , ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{52}Tr and ^{56}Fe .

The antibodies and antibody fragments of the invention may also be conjugated with fluorescent or chemiluminescent labels, including fluorophores such as rare earth chelates, fluorescein and its derivatives, rhodamine and its derivatives, isothiocyanate, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, o-phthalaldehyde, fluorescamine, ^{152}Eu , dansyl, umbelliferone, luciferin, luminal label, isoluminal label, an aromatic acridinium ester label, an imidazole label, an acridinium salt label, an oxalate ester label, an aequorin label, 2,3-dihydrophthalazinediones, biotin/avidin, spin labels and stable free radicals.

The antibody molecules may also be conjugated to a cytotoxic factor such as diphtheria toxin, *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A chain, ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, *Aleurites fordii* proteins and compounds (*e.g.*, fatty acids), dianthin proteins, *Phytolacca americana* proteins PAPI, PAPII, and PAP-S, *momordica charantia* inhibitor, curcin, croton, *saponaria officinalis* inhibitor, mitogellin, restrictocin, phenomycin, and enomycin.

Any method known in the art for conjugating the antibody molecules of the invention to the various moieties may be employed, including those methods described by Hunter, *et al.*, (1962) *Nature* 144:945; David, *et al.*, (1974) *Biochemistry* 13:1014; Pain, *et al.*, (1981) *J. Immunol. Meth.* 40:219; and Nygren, J., (1982) *Histochem. and Cytochem.* 30:407. Methods for conjugating antibodies are conventional and very well known in the art.

In yet other embodiments, different constant domains may be appended to humanized V_L and V_H regions derived from the CDRs provided herein. For example, if a particular intended use of an antibody (or fragment) of the present invention were to call for altered effector functions, a heavy chain constant domain other than IgG1 may be used, or hybrid IgG1/IgG4 may be utilized.

Although IgG1 antibodies provide for long half-life and for effector functions, such as complement activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity, such activities may not be desirable for all uses of the antibody. In such instances an IgG4 constant domain, for example, may be used. In hu Mab8D5, the IgG4 constant domain differs from the native human IgG4 constant domain (Swiss-Prot Accession No. P01861.1, the disclosure of which is hereby incorporated by reference) at position 108, where the native Ser108 is replaced with Pro, in order to prevent a potential inter-chain disulfide bond between Cys106 and Cys109 that could interfere with proper intra-chain disulfide bond formation. See Angal *et al.* (1993) *Mol. Immunol.* 30:105.

V. Biological Activity of the Binding Compounds of the Invention

Binding compounds having the characteristics identified herein as being desirable in a humanized anti-TSLP antibody can be screened for inhibitory biologic activity *in vitro* or for suitable binding affinity.

Antibody affinities (*e.g.* for human TSLP) may be determined using standard analysis. Preferred humanized antibodies are those which bind human TSLP with a K_D value of no more than about 1x10⁻⁷ M; preferably no more than about 1x10⁻⁸ M; more preferably no more than about 1x10⁻⁹ M; and most preferably no more than about 1x10⁻¹⁰ M.

The antibodies and fragments thereof useful in the present compositions and methods are biologically active antibodies and fragments. As used herein, the term "biologically active" refers to an antibody or antibody fragment that is capable of binding the desired the antigenic epitope and directly or indirectly exerting a biologic effect. Typically, these effects result from the failure of TSLP to bind its receptor. In one embodiment, the antibody and fragments thereof useful in the present compositions and methods inhibit: hTSLP induced proliferation of a Baf-3

cell line transfected with hTSLP-receptor and IL-7Ralpha; hTSLP induced luciferase expression from a Baf-3 cell line transfected with the TSLP-receptor and a luciferase reporter system; hTSLP induced TARC secretion from human primary monocytes isolated from PBMCs; and induction of Th2 differentiation.

As used herein, the term “specific” refers to the selective binding of the antibody to the target antigen epitope. Antibodies can be tested for specificity of binding by comparing binding to TSLP to binding to irrelevant antigen or antigen mixture under a given set of conditions. If the antibody binds to TSLP at least 10, and preferably 20 or 50 times more than to irrelevant antigen or antigen mixture then it is considered to be specific. An antibody that “specifically binds” to TSLP does not bind to proteins that do not comprise the TSLP-derived sequences, i.e. “specificity” as used herein relates to TSLP specificity, and not any other sequences that may be present in the protein in question. For example, as used herein, an antibody that “specifically binds” to TSLP will typically bind to FLAG-h TSLP, which is a fusion protein comprising TSLP and a FLAG[®] peptide tag, but it does not bind to the FLAG[®] peptide tag alone or when it is fused to a protein other than TSLP.

VI. Pharmaceutical Compositions

To prepare pharmaceutical or sterile compositions, the antibody or fragment thereof is admixed with a pharmaceutically acceptable carrier or excipient, see, e.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences* and *U.S. Pharmacopeia: National Formulary*, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). Formulations of therapeutic and diagnostic agents may be prepared by mixing with physiologically acceptable carriers, excipients, or stabilizers in the form of, e.g., lyophilized powders, slurries, aqueous solutions or suspensions (see, e.g., Hardman, *et al.* (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis, *et al.* (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY).

Toxicity and therapeutic efficacy of the antibody compositions, administered alone or in combination with an immunosuppressive agent, can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g., for determining the LD₅₀ (the dose lethal to 50% of the population) and the ED₅₀ (the dose therapeutically effective in 50% of the

population). The dose ratio between toxic and therapeutic effects is the therapeutic index and it can be expressed as the ratio between LD₅₀ and ED₅₀. Antibodies exhibiting high therapeutic indices are preferred. The data obtained from these cell culture assays and animal studies can be used in formulating a range of dosage for use in humans. The dosage of such compounds lies preferably within a range of circulating concentrations that include the ED₅₀ with little or no toxicity. The dosage may vary within this range depending upon the dosage form employed and the route of administration utilized.

Suitable routes of administration include parenteral administration, such as intramuscular, intravenous, or subcutaneous administration. Administration of antibody used in the pharmaceutical composition or to practice the method of the present invention can be carried out in a variety of conventional ways, such as oral ingestion, inhalation, topical application or cutaneous, subcutaneous, intraperitoneal, parenteral, intraarterial or intravenous injection. In one embodiment, the binding compound of the invention is administered intravenously. In another embodiment, the binding compound of the invention is administered subcutaneously.

Alternately, one may administer the antibody in a local rather than systemic manner, for example, via injection of the antibody directly into an arthritic joint or pathogen-induced lesion characterized by immunopathology, often in a depot or sustained release formulation. Furthermore, one may administer the antibody in a targeted drug delivery system, for example, in a liposome coated with a tissue-specific antibody, targeting, for example, arthritic joint or pathogen-induced lesion characterized by immunopathology. The liposomes will be targeted to and taken up selectively by the afflicted tissue.

Selecting an administration regimen for a therapeutic depends on several factors, including the serum or tissue turnover rate of the entity, the level of symptoms, the immunogenicity of the entity, and the accessibility of the target cells in the biological matrix. Preferably, an administration regimen maximizes the amount of therapeutic delivered to the patient consistent with an acceptable level of side effects. Accordingly, the amount of biologic delivered depends in part on the particular entity and the severity of the condition being treated. Guidance in selecting appropriate doses of antibodies, cytokines, and small molecules are available (see, e.g., Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert, *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom, *et al.* (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon, *et al.* (2001)

New Engl. J. Med. 344:783-792; Beniaminovitz, *et al.* (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh, *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky, *et al.* (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602).

Determination of the appropriate dose is made by the clinician, e.g., using parameters or factors known or suspected in the art to affect treatment or predicted to affect treatment. Generally, the dose begins with an amount somewhat less than the optimum dose and it is increased by small increments thereafter until the desired or optimum effect is achieved relative to any negative side effects. Important diagnostic measures include those of symptoms of, e.g., the inflammation or level of inflammatory cytokines produced. Preferably, a biologic that will be used is derived from the same species as the animal targeted for treatment, thereby minimizing an inflammatory, autoimmune, or proliferative response to the reagent.

Antibodies, antibody fragments, and cytokines can be provided by continuous infusion, or by doses at intervals of, e.g., one day, one week, or 1-7 times per week. Doses may be provided intravenously, subcutaneously, topically, orally, nasally, rectally, intramuscular, intracerebrally, intraspinally, or by inhalation. A preferred dose protocol is one involving the maximal dose or *dose* frequency that avoids significant undesirable side effects. A total weekly dose is generally at least 0.05 µg/kg body weight, more generally at least 0.2 µg/kg, most generally at least 0.5 µg/kg, typically at least 1 µg/kg, more typically at least 10 µg/kg, most typically at least 100 µg/kg, preferably at least 0.2 mg/kg, more preferably at least 1.0 mg/kg, most preferably at least 2.0 mg/kg, optimally at least 10 mg/kg, more optimally at least 25 mg/kg, and most optimally at least 50 mg/kg (see, e.g., Yang, *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Herold, *et al.* (2002) *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liu, *et al.* (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portielji, *et al.* (20003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:133-144). The desired dose of a small molecule therapeutic, e.g., a peptide mimetic, natural product, or organic chemical, is about the same as for an antibody or polypeptide, on a moles/kg basis.

As used herein, “inhibit” or “treat” or “treatment” includes a postponement of development of the symptoms associated with autoimmune disease or pathogen-induced immunopathology and/or a reduction in the severity of such symptoms that will or are expected to develop. The terms further include ameliorating existing uncontrolled or unwanted autoimmune-related or pathogen-induced immunopathology symptoms, preventing additional symptoms, and ameliorating or preventing the underlying causes of such symptoms. Thus, the terms denote that a beneficial result has been conferred on a vertebrate subject with an inflammatory disease.

As used herein, the term “therapeutically effective amount” or “effective amount” refers to an amount of an anti-TSLP antibody or fragment thereof, that when administered alone or in combination with an additional therapeutic agent to a cell, tissue, or subject is effective to prevent or ameliorate the autoimmune disease or pathogen-induced immunopathology associated disease or condition or the progression of the disease. A therapeutically effective dose further refers to that amount of the compound sufficient to result in amelioration of symptoms, *e.g.*, treatment, healing, prevention or amelioration of the relevant medical condition, or an increase in rate of treatment, healing, prevention or amelioration of such conditions. When applied to an individual active ingredient administered alone, a therapeutically effective dose refers to that ingredient alone. When applied to a combination, a therapeutically effective dose refers to combined amounts of the active ingredients that result in the therapeutic effect, whether administered in combination, serially or simultaneously. An effective amount of therapeutic will decrease the symptoms typically by at least 10%; usually by at least 20%; preferably at least about 30%; more preferably at least 40%, and most preferably by at least 50%.

Methods for co-administration or treatment with an anti-TSLP antibody or antigen-binding fragment thereof of the present invention and a second therapeutic agent, *e.g.*, a cytokine, steroid, chemotherapeutic agent, antibiotic, or radiation (or any such agent discussed herein) form part of the present invention, see, generally, *e.g.*, *Hardman, et al.* (eds.) (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed., McGraw-Hill, New York, NY; Poole and Peterson (eds.) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner and Longo (eds.) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA. The antibodies and antigen-binding fragments thereof and pharmaceutical compositions thereof of the invention may also contain other immunosuppressive or immunomodulating agents. Any suitable immunosuppressive agent can be employed, including but not limited to anti-inflammatory agents, corticosteroids, cyclosporine, tacrolimus (*i.e.*, FK-506), sirolimus, interferons, soluble cytokine receptors (*e.g.*, sTNRF and sIL-1R), agents that neutralize cytokine activity (*e.g.*, inflixmab, adalimumab, golimumab, etanercept), mycophenolate mofetil, 15-deoxyspergualin, thalidomide, glatiramer, azathioprine, leflunomide, cyclophosphamide, methotrexate, and the like. Non-steroidal anti-inflammatory drugs may also be provided with an antibody or antigen-binding fragment thereof or pharmaceutical composition thereof of the present invention. The pharmaceutical composition can also be employed with other therapeutic modalities such as phototherapy and radiation. The scope of

the present invention includes compositions comprising any antibody or antigen-binding fragment thereof of the present invention and any second therapeutic agent (e.g., as discussed herein, e.g., wherein the antibody or fragment is formulated separately from the second therapeutic agent or wherein they are formulated together).

Typical veterinary, experimental, or research subjects include monkeys, dogs, cats, rats, mice, rabbits, guinea pigs, horses, and humans.

VII. Antibody Production

For recombinant production of the antibodies of the present invention, the nucleic acids encoding the two chains are isolated and inserted into one or more replicable vectors for further cloning (amplification of the DNA) or for expression. DNA encoding the monoclonal antibody is readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of the antibody). Many vectors are available. The vector components generally include, but are not limited to, one or more of the following: a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence. In one embodiment, both the light and heavy chains of the humanized anti-TSLP antibody of the present invention are expressed from the same vector, e.g. a plasmid or an adenoviral vector.

Antibodies and antigen-binding fragments thereof of the present invention may be produced by any method known in the art. In one embodiment, antibodies are expressed in mammalian or insect cells in culture, such as Chinese hamster ovary (CHO) cells, human embryonic kidney (HEK) 293 cells, mouse myeloma NSO cells, baby hamster kidney (BHK) cells, *Spodoptera frugiperda* ovarian (Sf9) cells. In one embodiment of the invention, the antibodies and antigen-binding fragments thereof are produced in fungal cells such as *Pichia* cells, *Pichia pastoris* cells, *Pichia finlandica* cells, *Pichia trehalophila* cells, *Pichia koclamae* cells, *Pichia membranaefaciens* cells, *Pichia minuta* cells (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), *Pichia opuntiae* cells, *Pichia thermotolerans* cells, *Pichia salictaria* cells, *Pichia guercuum* cells, *Pichia pijperi* cells, *Pichia stiptis* cells, *Pichia methanolica* cells, *Saccharomyces cerevisiae* cells, *Saccharomyces* cells, *Hansβnula polymorpha* cells, *Kluyveromyces* cells, *Kluyveromyces lactis* cells, *Candida albicans* cells, *Aspergillus nidulans* cells, *Aspergillus niger* cells, *Aspergillus oryzae* cells, *Trichoderma reesei* cells, *Chrysosporium lucknowense* cells, *Fusarium* cells, *Fusarium gramineum* cells, *Fusarium venenatum* cells or *Neurasporea crassa* cells.

28

In one embodiment, antibodies secreted from CHO cells are recovered and purified by standard chromatographic methods, such as protein A, cation exchange, anion exchange, hydrophobic interaction, and hydroxyapatite chromatography. Resulting antibodies are concentrated and stored in 20 mM sodium acetate, pH 5.5.

In another embodiment, the antibodies of the present invention are produced in yeast according to the methods described in WO2005/040395. Briefly, vectors encoding the individual light or heavy chains of an antibody of interest are introduced into different yeast haploid cells, e.g. different mating types of the yeast *Pichia pastoris*, which yeast haploid cells are optionally complementary auxotrophs. The transformed haploid yeast cells can then be mated or fused to give a diploid yeast cell capable of producing both the heavy and the light chains. The diploid strain is then able to secrete the fully assembled and biologically active antibody. The relative expression levels of the two chains can be optimized, for example, by using vectors with different copy number, using transcriptional promoters of different strengths, or inducing expression from inducible promoters driving transcription of the genes encoding one or both chains.

In one embodiment, the respective heavy and light chains of the anti-TSLP antibody are introduced into yeast haploid cells to create a library of haploid yeast strains of one mating type expressing a plurality of light chains, and a library of haploid yeast strains of a different mating type expressing a plurality of heavy chains. These libraries of haploid strains can be mated (or fused as spheroplasts) to produce a series of diploid yeast cells expressing a combinatorial library of antibodies comprised of the various possible permutations of light and heavy chains. The combinatorial library of antibodies can then be screened to determine whether any of the antibodies has properties that are superior (e.g. higher affinity for TSLP) to those of the original antibodies. See, e.g., WO2005/040395.

In another embodiment, antibodies of the present invention are human domain antibodies in which portions of an antibody variable domain are linked in a polypeptide of molecular weight approximately 13 kDa. See, e.g., U.S. Pat. Publication No. 2004/0110941. Such single domain, low molecular weight agents provide numerous advantages in terms of ease of synthesis, stability, and route of administration.

VIII. Uses

The present invention provides methods for using engineered anti-TSLP for the treatment and diagnosis of inflammatory disorders (for example, in mammals such as humans).

In a preferred embodiment, the inflammatory disorder is asthma.

In another preferred embodiment, the inflammatory disorder is an allergic inflammatory disorder. In a preferred embodiment, the allergic inflammatory disorder is allergic rhinosinusitis, allergic asthma, allergic conjunctivitis, or atopic dermatitis.

The present invention provides methods for using engineered anti-TSLP for the treatment and diagnosis of fibrosis, inflammatory bowel disease, Hodgkin's lymphoma, respiratory viral infections or other viral infections, rheumatoid arthritis, or any other disorder characterized by inflammation at the site of injury.

The broad scope of this invention is best understood with reference to the following examples, which are not intended to limit the inventions to the specific embodiments.

All citations herein are incorporated herein by reference to the same extent as if each individual publication or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

Many modifications and variations of this invention can be made without departing from its spirit and scope, as will be apparent to those skilled in the art. The specific embodiments described *herein* are offered by way of example only, and the invention is to be limited by the terms of the appended claims, along with the full scope of equivalents to which such claims are entitled; and the invention is not to be limited by the specific embodiments that have been presented herein by way of example.

Example 1

General Methods

Standard methods in molecular biology are described (Maniatis *et al.* (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). Standard methods also appear in Ausbel *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols.1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, which describes cloning in bacterial cells and DNA mutagenesis (Vol. 1), cloning in mammalian cells and yeast (Vol. 2), glycoconjugates and protein expression (Vol. 3), and bioinformatics (Vol. 4).

Methods for protein purification including immunoprecipitation, chromatography, electrophoresis, centrifugation, and crystallization are described (Coligan *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York). Chemical analysis, chemical modification, post-translational modification, production of fusion proteins, glycosylation of proteins are described (see, e.g., Coligan *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp. 384-391). Production, purification, and fragmentation of polyclonal and monoclonal antibodies are described (Coligan *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow and Lane, *supra*). Standard techniques for characterizing ligand/receptor interactions are available (see, e.g., Coligan *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York).

Single chain antibodies and diabodies are described (see, e.g., Malecki *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:213-218; Conrath *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:7346-7350; Desmyter *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:26285-26290; Hudson and Kortt (1999) *J. Immunol. Methods* 231:177-189; and U.S. Pat. No. 4,946,778). Bifunctional antibodies are provided (see, e.g., Mack, *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7021-7025; Carter (2001) *J. Immunol. Methods* 248:7-15; Volkel, *et al.* (2001) *Protein Engineering* 14:815-823; Segal, *et al.* (2001) *J. Immunol. Methods* 248:1-6; Brennan, *et al.* (1985) *Science* 229:81-83; Raso, *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:27623; Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; Traunecker, *et al.* (1991) *EMBO J.* 10:3655-3659; and U.S. Pat. Nos. 5,932,448, 5,532,210, and 6,129,914).

Bispecific antibodies are also provided (see, e.g., Azzoni *et al.* (1998) *J. Immunol.* 161:3493; Kita *et al.* (1999) *J. Immunol.* 162:6901; Merchant *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275:9115; Pandey *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275:38633; Zheng *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:12999; Propst *et al.* (2000) *J. Immunol.* 165:2214; Long (1999) *Ann. Rev. Immunol.* 17:875).

Antibodies can be conjugated, e.g., to small drug molecules, enzymes, liposomes, polyethylene glycol (PEG). Antibodies are useful for therapeutic, diagnostic, kit or other purposes, and include antibodies coupled, e.g., to dyes, radioisotopes, enzymes, or metals, e.g., colloidal gold (see, e.g., Le Doussal *et al.* (1991) *J. Immunol.* 146:169-175; Gibellini *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160:3891-3898; Hsing and Bishop (1999) *J. Immunol.* 162:2804-2811; Everts *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168:883-889).

Methods for flow cytometry, including fluorescence activated cell sorting (FACS), are available (see, e.g., Owens *et al.* (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2nd ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ). Fluorescent reagents suitable for modifying nucleic acids, including nucleic acid primers and probes, polypeptides, and antibodies, for use, e.g., as diagnostic reagents, are available (Molecular Probes (2003) *Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) *Catalogue*, St. Louis, MO).

Standard methods of histology of the immune system are described (see, e.g., Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, New York, NY; Hiatt, *et al.* (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, PA; Louis, *et al.* (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, New York, NY).

Software packages and databases for determining, e.g., antigenic fragments, leader sequences, protein folding, functional domains, glycosylation sites, and sequence alignments, are available (see, e.g., GenBank, Vector NTI[®] Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher[®] (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne *et al.* (2000) *Bioinformatics* 16: 741-742; Menne *et al.* (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16:741-742; Wren *et al.* (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181; von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690).

Example 2

Optimization of Anti-TSLP Antibody Sequence to Avoid Deamidation Problems

A humanized antibody that binds to human and cyno TSLP was disclosed in International Patent Publication WO2008/076321. Upon further analysis of this sequence, the inventor identified that the CDR-H2 of this antibody contains two asparagine (N) residues at positions 61 and 63 of SEQ ID NO: 4 of WO2008/076321 which could potentially deamidate and thereby disrupt the structure of the antibody potentially causing severe unintended problems affecting the safety and/or efficacy of the antibody. In order to avoid these problems, the inventors created an improved antibody that avoided these deamidation problems, yet preserved the affinity for human and cyno TSLP and avoided further problems relating to immunogenicity. This improved antibody comprises the variable heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:7. The CDR-H2 of this amino acid sequence corresponds to SEQ ID NO:2.

Figure 1 provides an alignment of SEQ ID NO:11 of the instant application against SEQ ID NO:14 of WO2008/076321 (i.e., an alignment of the heavy chains of the antibody claimed herein and the antibody disclosed in WO2008/076321. In Figure 1, "Sequence 1" corresponds to SEQ ID NO:11 of the instant application and "Sequence 2" corresponds to ID NO:14 of WO2008/076321. In the antibody claimed herein, the asparagine (N) at position at position 61 of SEQ ID NO: 14 of WO2008/076321 was changed to alanine (A) and the asparagine at position 63 of SEQ ID NO: 14 was changed to lysine (K). These changes were made to avoid the potential deamidation of these residues. Additionally, the lysine (K) at position 65 of SEQ ID NO: 4 of WO2008/076321 was changed to Glutamine (Q). This change was made to decrease the chances of creating immunogenicity. A further change was made at position 72 of SEQ ID NO: 14 of WO2008/076321, where a threonine (T) was changed to an alanine (A). This change was made to improve the binding affinity of the antibody.

It was surprisingly found that the changes in CDR-H2 did not substantially affect the binding affinity of the resulting antibody.

A vector containing the genes encoding the heavy and light chain of the antibody disclosed herein was deposited with the ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, on November 17, 2009 and received ATCC Deposit No. PTA-10482. This deposit was made under the conditions provided by the Budapest Treaty. The nucleic acid sequences encoding the light and heavy chains (including signal peptides) are in a single plasmid, and both genes are expressed from the human cytomegalovirus (CMV) promoter. The plasmid also

contains an ampicillin resistant gene for selection in mammalian cells and a DHFR gene for gene amplification .

Example 3

Determining the Equilibrium Dissociation Constant (K_D) for Humanized Anti-human TSLP Using KinExA Technology

The equilibrium dissociation constant (K_D) was determined using the KinExA 3000 instrument (Sapidyne Instruments Inc., www.sapidyne.com). The KinExA uses the principle of the Kinetic Exclusion Assay method based on measuring the concentration of uncomplexed antibody in a mixture of antibody, antigen and antibody-antigen complex. The concentration of free antibody is measured by exposing the mixture to a solid-phase immobilized antigen for a very brief period of time. In practice, this is accomplished by flowing the solution phase antigen-antibody mixture past antigen-coated particles trapped in a flow cell. Data generated by the instrument are analyzed using custom software. Equilibrium constants are calculated using a mathematical theory based on the following assumptions:

1. The binding follows the reversible binding equation for equilibrium:

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

2. Antibody and antigen bind 1:1 and total antibody equals antigen-antibody complex plus free antibody.
3. Instrument signal is linearly related to free antibody concentration.

Materials

Antibodies:

- Antibody 1: Parental rat antibody 23B12
- Antibody 2: Humanized anti hu TSLP mAb 23B12 (comprising the heavy chain of SEQ ID NO:14 and the light chain of SEQ ID NO:16 of WO2008/076321)
- Antibody 3: Humanized anti hu TSLP mAb 23B12 (comprising the heavy chain of SEQ ID NO:14 with a mutation at position 72 from T to A, and the light chain of SEQ ID NO:16 of WO2008/076321)
- Antibody 4: Humanized anti hu TSLP mAb 23B12 (comprising the heavy chain of SEQ ID NO:11 and the light chain of SEQ ID NO:12 of the instant application)

Antigens:

- Recombinant human TSLP

Biotinylated antigens:

- Biotinylated human TSLP

Other reagents:

- PMMA particles, 98 micron (Sapidyne, Cat No. 440198)
- Neutravidin (Pierce, Cat No. 31000)
- Cy5-conjugated Goat anti-rat IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Cat. No 112-175-167, Lot 60306)
- Cy5-conjugated Goat anti-HuIgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Cat. No 109-175-088, lot 49069 and lot 58552)

Experimental conditions:

PMMA particles were coated with biotinylated human TSLP according to Sapidyne “Protocol for coating PMMA particles with biotinylated ligands having short or nonexistent linker arms”. All experimental procedures were done according to the KinExA 3000 manual. All runs were done in duplicate.

The following conditions were used:

- Sample volume: 2 mL
- Sample flow rate: 0.25 mL/min
- Label volume: 1 mL
- Label flow rate: 0.25 mL/min
- Antibody conc.: 0.1 nM
- Highest antigen conc.: 10 nM
- Lowest antigen conc.: 10 pM

Two-fold serial dilutions of the antigen were prepared and mixed with the antibody at constant concentration. The mixture was incubated for 2 hours at 25°C to equilibrate.

Table 3
K_D Values Determined by KinExa

mAb	TSLP	Expression	K _D (pM)
Antibody 1	human	HEK293	1.1
Antibody 2	human	HEK293	7.7
Antibody 3	human	HEK293	1.6
Antibody 4	human	HEK293	3.2

Example 4

Affinity Of Antibodies For Human And Cyno TSLP

The kinetic binding activities of the parental rat and the various humanized derivative anti human TSLP antibodies against both human (hu) and cynomolgus monkey (cyno) TSLP were measured by surface plasmon resonance using a BIAcore T100 system (BIAcore AB, Upsalla, Sweden). Approximately 100RUs of human TSLP or cyno TSLP were immobilized via amine coupling chemistry onto a Sensor Chip CM5 (Research grade, BR-1006-68). HBS-EP buffer (BR-1006-69) was used as the running buffer with a flow rate of 30μL/min. rat and humanized 23B12 antibodies at varying concentrations ranging from 0.82 to 600 nM were injected over the immobilized hu or cyno TSLP surfaces at a flow rate of 30μL/min. Following each injection cycle the CM5 chip surface was regenerated using a series of solutions (10 mM Glycine pH 1.5 and 25 mM NaOH repectively) at a flow rate of 75μL/min.

Background subtraction binding sensorgrams were used for analyzing the rate constant of association (ka) and dissociation (kd), and the equilibrium dissociation constant KD. The resulting data sets were fitted with a bivalent analyte model using the BIAevaluation software (version 1.0). The KD determined for the various antibodies are shown in Table 4. The results of individual experiments are shown in separate lines.

Table 4
BIAcore Analysis

TSLP	KD (pM)			
	Antibody 1	Antibody 2	Antibody 3	Antibody 4
human	141	Not determined	Not determined	172
human	130	150	128	Not determined
human	Not determined	Not determined	Not determined	155, 142, 339,170, 153
human*	Not determined	Not determined	Not determined	339
human*, **	Not determined	Not determined	Not determined	299
cyno	159	Not determined	Not determined	138, 80, 115
cyno	Not determined	Not determined	Not determined	127
cyno **	Not determined	Not determined	Not determined	381

* This particular experiment used TSLP purchased from R&D and expressed in E. coli. The other experiments were conducted with TSLP expressed in HEK293 cells.

** These experiments were conducted at 37 °C. All other experiments were conducted at room temperature.

Antibody 1: Parental rat antibody 23B12
Antibody 2: Humanized anti hu TSLP mAb 23B12 (comprising the heavy chain of SEQ ID NO:14 and the light chain of SEQ ID NO:16 of WO2008/076321)
Antibody 3: Humanized anti hu TSLP mAb 23B12 (comprising the heavy chain of SEQ ID NO:14 with a mutation at position 72 from T to A; and the light chain of SEQ ID NO:16 of WO2008/076321)
Antibody 4: Humanized anti hu TSLP mAb 23B12 (comprising the heavy chain of SEQ ID NO:11 and the light chain of SEQ ID NO:12 of the instant application)

Example 5

Proliferation Bioassay For The Assessment Of Neutralizing Anti-TSLP Antibody

The ability of the various anti-TSLP antibodies to biologically neutralize human and cyno TSLP was assessed by the application of short-term proliferation bioassays that utilize cells which express recombinant human and cyno TSLP receptors. The transfectant Ba/F3-TSLPR-IL7Ra cells proliferate in response to TSLP and the response can be inhibited by a neutralizing anti-TSLP antibody. Each antibody was titrated against a concentration of TSLP chosen within the linear region of the TSLP dose-response curve, near plateau and above the TSLP EC₅₀. Proliferation, or lack thereof, is measured by colorimetric means using Alamar Blue, a growth indicator dye based on detection of metabolic activity. The ability of an antibody to neutralize TSLP is assessed by its EC₅₀ value, or concentration of antibody that induces half-maximal inhibition of TSLP proliferation.

Ba/F3 transfectants are maintained in RPMI-1640 medium, 10% fetal calf serum, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-Glutamine, 50 μ g/mL penicillin-streptomycin, and 10 ng/mL mouse IL-3.

Ba/F3 proliferation bioassays are performed in RPMI-1640 medium, 10% fetal calf serum, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-Glutamine, and 50 μ g/mL penicillin-streptomycin.

The assay is performed in 96-well flat bottom plates (Falcon 3072 or similar). All preparations of reagents and cell suspensions utilize the appropriate bioassay medium. The assay volume is 150 μ L per well. Titrations of an anti-TSLP antibody are pre-incubated with TSLP for 30-60 minutes at room temperature, during which time cells are prepared. Cells are added to plates following the antibody-cytokine pre-incubation. Bioassay plates are incubated in a humidified tissue culture chamber (37C, 5% CO₂) for 40-48 hours. At the end of the culture time, Alamar Blue (Biosource Cat #DAL1100) is added and allowed to develop for 8-12 hours. Absorbance is then read at 570 nm and 600 nm (VERSAmax Microplate Reader, Molecular Probes), and an OD₅₇₀₋₆₀₀ is obtained. Duplicates or triplicates are recommended.

Cells are used in a healthy growth state, generally at densities of 3-8 x 10⁵/mL. Cells are counted, pelleted, washed twice in bioassay medium, and suspended to the appropriate density for plating.

TSLP was prepared to working concentration and added to first well at 75 μ L. Serial dilutions of 1:3 were made by titrating 25:50 μ L in bioassay medium across wells, leaving 50 μ L/well. Cells were suspended to the appropriate density for plating at 100 μ L per well.

The antibody was prepared to working concentration and added to the first well at 75 μ L. Serial dilutions of 1:3 were made by titrating 25:50 μ L in bioassay medium across wells,

leaving 50 μ L per well. TSLP at the appropriate concentration was added at 50 μ L per well to the wells containing the titrated antibody. Cells were suspended to the appropriate density for plating at 50 μ L per well, and added following the antibody-cytokine pre-incubation.

Using GraphPad Prism 3.0 software, absorbance was plotted against cytokine or antibody concentration and EC50 values were determined using non-linear regression (curve fit) of sigmoidal dose-response.

The assay results are shown in Table 5. The results of individual experiments are shown in separate lines.

Table 5
Inhibition Of Proliferation

TSLP	EC 50 (μ g/ml)			
	Antibody 1	Antibody 2	Antibody 3	Antibody 4
human	0.022	Not determined	Not determined	0.041
human	0.025	0.092	0.054	Not determined
human	0.014	Not determined	Not determined	0.024
human*	0.083	Not determined	Not determined	0.215, 0.137
cyno	0.064	Not determined	Not determined	0.117, 0.077
cyno	0.122	Not determined	Not determined	0.158
cyno	0.054	Not determined	Not determined	0.067

* This particular experiment used TSLP purchased from R&D and expressed in E. coli. The other experiments were conducted with TSLP expressed in HEK293 cells.

Antibody 1: Parental rat antibody 23B12

Antibody 2: Humanized anti hu TSLP mAb 23B12 (comprising the heavy chain of SEQ ID NO:14 and the light chain of SEQ ID NO:16 of WO2008/076321)

Antibody 3: Humanized anti hu TSLP mAb 23B12 (comprising the heavy chain of SEQ ID NO:14 with a mutation at position 72 from T to A; and the light chain of SEQ ID NO:16 of WO2008/076321)

Antibody 4: Humanized anti hu TSLP mAb 23B12 (comprising the heavy chain of SEQ ID NO:11 and the light chain of SEQ ID NO:12 of the instant application)

A summary of the results presented in Table 5 including average values and SD (standard deviation) is provided in Table 6. (Only the values obtained using TSLP expressed in HEK293 cells were used to calculate the values provided in Table 6.)

Table 6

	Bioassay (pM) Ba/F3 transfectant	
	hTSLP (SD)	cTSLP (SD)
Antibody 1	120 (37)	528 (242)
Antibody 4	214 (80)	691 (274)

Example 6

Neutralizing Activity Of Anti-TSLP On TSLP Induced TARC Production By Human Primary Dendritic Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from buffy coats obtained from healthy blood donors (Stanford Medical School Blood Center, Stanford, CA) by Ficoll centrifugation and CD11c⁺ Dendritic Cells were obtained by MACS (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) using negative selection followed by cell sorting using a FACS. Lineage negative (Lin⁻) cells were obtained by MACS depletion of T cells, B cells, NK cells, red blood cells and monocytes from PBMC using mouse anti-human CD3 mAb (OKT3, DNAX) and mouse anti-CD16 mAb and goat anti-mouse IgG coated magnetic beads (Miltenyi Biotech), and using magnetic beads directly coated with anti-CD19, CD56 and CD14 mAbs (Miltenyi Biotech). Subsequently, Lin⁻ cells were stained with TC-anti-CD4 (Caltag, Burlingame, CA), PE-anti-CD11c and FITC-anti-CD3, -CD14, -CD19, -CD56, -CD16, and -CD20 (all BD Biosciences, San Diego, CA) and CD11c⁺ DC sorted on a Vantage FACSsorter™ (BD Biosciences) to a purity > 99% of CD11c⁺ CD4⁺ Lin⁻ cells.

CD11c⁺ CD4⁺ DCs were cultured immediately after sorting in RPMI (Mediatech, Herndon, VA) containing 10% FCS and 1% pyruvate (Mediatech), HEPES (Invitrogen, Grand Island, NY) and penicillin-streptomycin (Mediatech). Cells were seeded at 0.5×10^6 /ml in flat-bottomed 96-well plates in the presence of medium alone, TSLP (15 ng/ml, DNAX), or in a combination of TSLP and the neutralizing anti-TSLP mAb (clone 23B12) or an anti-TSLPR monoclonal antibody or an isotype control rat IgG2a (R&D Systems, Minneapolis, MN). DC culture supernatants were collected after 24 h of culture, stored frozen at -20 °C and analyzed for TARC protein levels by ELISA (R&D Systems).

The results are summarized in Table 7. The results of individual experiments are shown in separate lines.

Table 7

TSLP	EC 50 (µg/ml)	
	Antibody 1	Antibody 4
human	0.12	0.16
human	0.0069	0.0077
human	0.031	0.060
human (R&D)*	0.050	0.102, 0.126
human (R&D)*	0.113	0.067, 0.173
human (R&D)*	0.228	0.424
human (R&D)*	0.404	0.164

* These experiments used TSLP purchased from R&D and expressed in E. coli. The other experiments were conducted with TSLP expressed in HEK293 cells.

Antibody 1: Parental rat antibody 23B12

Antibody 4: Humanized anti hu TSLP mAb 23B12 (comprising the heavy chain of SEQ ID NO:11 and the light chain of SEQ ID NO:12 of the instant application)

A summary of the results presented in Table 7 including average values and SD (standard deviation) is provided in Table 8.

Table 8

	Bioassay (pM)	
	TARC production by human DCs	
	hTSLP (SD)	hTSLP* (SD)
Antibody 1	345 (389)	1312 (1025)
Antibody 4	492 (502)	1161 (843)

* These experiments used TSLP purchased from R&D and expressed in E. coli. The other experiments were conducted with TSLP expressed in HEK293 cells.

Example 7

Neutralizing Activity Of Anti-TSLP Antibodies On TSLP-Induced MDC Production By Cynomolgus Monkey Splenocytes

Total splenocyte suspensions were prepared from Cynomolgus monkey spleen by disruption of the tissue and passing it through a 50 mesh stainless steel tissue sieve (Bellco) followed by passage through a 70 micrometer Nylon Cell strainer (BD Falcon). Cell suspensions were washed in DPBS by centrifugation and cell pellets were resuspended in pre-warmed 37°C ACK lysis Buffer (BioWhittaker) to lyse Red Blood Cells and incubated for 5 minutes at 37°C. Cells were diluted in DPBS, washed twice and resuspended in culture medium.

32

Splenocytes were cultured in RPMI (Mediatech, Herndon, VA) containing 10% FCS and 1% pyruvate (Mediatech), HEPES (Invitrogen, Grand Island, NY) and penicillin-streptomycin (Mediatech). Cells were seeded at 1.0×10^6 /ml in flat-bottomed 96-well plates in the presence of medium alone, TSLP (0.1 ng/ml), or in a combination of TSLP and the neutralizing anti-TSLP mAb (Antibody 1 or Antibody 4). Splenocyte culture supernatants were collected after 120 h of culture, stored frozen at -20 °C and analyzed for MDC protein levels by a human MDC ELISA (R&D Systems).

The results are summarized in Table 9. The results of individual experiments are shown in separate lines.

Table 9

TSLP	IC 50 (ug/ml)	
	Antibody 1	Antibody 4
cyno	0.012	0.012
cyno	0.030	0.028, 0.008
cyno	0.018	0.054
cyno	0.033	0.023

Antibody 1: Parental rat antibody 23B12
Antibody 4: Humanized anti hu TSLP mAb 23B12 (comprising the heavy chain of SEQ ID NO:11 and the light chain of SEQ ID NO:12 of the instant application)

Many modifications and variations of this invention can be made without departing from its spirit and scope, as will be apparent to those skilled in the art. The specific embodiments described herein are offered by way of example only, and the invention is to be limited by the terms of the appended claims, along with the full scope of equivalents to which such claims are entitled; and the invention is not to be limited by the specific embodiments that have been presented herein by way of example.

Citation of the above publications or documents is not intended as an admission that any of the foregoing is pertinent prior art, nor does it constitute any admission as to the contents or date of these publications or documents. U.S. patents and other publications referenced herein are hereby incorporated by reference.

SEQUENCE LISTING

The present invention includes any isolated polypeptide or isolated nucleic acid including any of the following amino acid or nucleotide sequences, respectively:

SEQ ID NO:	Sequence
1	GYIFTDYAMH
2	TFIPLDTSYQAQKFQG
3	MGVTHSYVMDA
4	RASQPISISVH
5	FASQSIG
6	QQTFSLPYT
7	variable heavy chain amino acid sequence QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGTFIPLDTSYQAQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELRSLRSDDAVYYCARMGVTHSYVMDAWGQGLTVTVSS
8	variable light chain amino acid sequence EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQPISISVHWYQQKPGQAPRLLIYFASQSIGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTFSLPYTFGQGTKVEIKRT
9	nucleic acid sequence encoding variable heavy chain cagggtgcagctgggtgcagctctggcgccgaagtgaagaaacctggcgccctccgtgaagggtgctctgcaaggcctccggctacatcttca ccgactacgccatgcactgggtccgccaggctccaggacaggccctggaatggatgggcaccttcacccctctgctggacacacctga ctacgccagaaattccagggcagagtaccatgaccgccgacacctccacctccaccgcctacatggaactgcggctccctgagatc cgacgacaccgccgtgtactactgcgcccggatggcggtgacacactcctacgtgatggacgcttggggccagggcaccctggtcac cgtgctctcc
10	nucleic acid sequence encoding the variable light chain gagatcgtgctgacccagctccctggcaccctgtctctgtctccggcgagagagccaccctgtctgcccggcctcccagcctatctcc atctccgtgactgtatcagcagaagccaggacaggccctcggctgtgctgactctcgtctcagctatctctggcatccctgaccg gttctccggctctggctccggcaccgacttcaccctgacctctccggctggaacctgaggacttcgctgtactactgccagcagac cttctccctgccttacaccttcggccagggcaccagggtggagatcaagcgtagc
11	heavy chain amino acid sequence QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGTFIPLDTSYQAQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELRSLRSDDAVYYCARMGVTHSYVMDAWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
12	light chain amino acid sequence EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQPISISVHWYQQKPGQAPRLLIYFASQSIGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTFSLPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRPAKVKQKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13	nucleic acid sequence encoding the heavy chain cagggtgcagctgggtgcagctctggcgccgaagtgaagaaacctggcgccctccgtgaagggtgctctgcaaggcctccggctacatcttca ccgactacgccatgcactgggtccgccaggctccaggacaggccctggaatggatgggcaccttcacccctctgctggacacacctga ctacgccagaaattccagggcagagtaccatgaccgccgacacctccacctccaccgcctacatggaactgcggctccctgagatc cgacgacaccgccgtgtactactgcgcccggatggcggtgacacactcctacgtgatggacgcttggggccagggcaccctggtcac cgtgctctccgctagcaccaaggccctccgtgttccctctggcccttctccaagtctaccttggcgccaccgctgctctgggtgtct gggtcaaggactacttccctgagcctgtgacagctcttggaaactctggcgccctgacctccggcgtgacaccttccctgccgtgctgag ctagtggcctgtactccctgtctccgtggtcacagtgccttcacatccctgggcacccagacctacatctgcaactgaaccacaagcc ttccaacaccaagggtggacaagaagggtggagcctaagtcctgcgacaagaccacacctgtcctccatgccctgcccctgagctgtg ggcggaacctccgtgttctgttccctcctaagcctaaggacacctgatgatctccggaccctgaagtgaacctgcgtgggtgggac gtgtcccacgaggaccagaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggagggtgacacagccaagaccaagcctcgggagg aacagtacaactccacctaccgggtgtgtccgtgctgaccgtgctgaccaggactggctgaacggcaagaatacaagtgaagg gttccaacaaggccctgctgcccctatcgaaaagaccatctccaaggccaaggccagccaagagaacctcagggttacacctg cctccctctcgggacgagctgaccaagaaccaggtgtccctgacatgcctgtgcaagggttctaccttccgatccggtggagtg gagcttaacggccagcctgagaacaactacaagaccacctcctgtgtgactccgacggctccttctcctgtactccaagctgacc gtggacaagtccgggtggcagcagggaacgtgttctcctgctcctgtatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtc ctgtccctgtctctggcaag

3

14	nucleic acid sequence encoding the light chain gagatcgtgctgacccagtcacctggcaccctgtctgtctcccggcgagagagccaccctgtcctgccgggcctcccagcctatctcc atctccgtgcactgggtatcagcagaagccaggacaggcccctcggctgctgatctacttcgcttctcagttatctctggcatccctgaccg gttctccggctctggctccggcaccgacttcacctgacctctccggctggaacctgaggacttcgctgtactactgccagcagac cttctccctgccttacaccttcggccagggcaccaaggtggagatcaagcgtacgggtggcgcctcttcggtgtcatcttccctccctccg acgagcagctgaagtcggcaccgcctctgtctgtcctgtgaacaacttctaccctcgggaggccaaggtgcagtgggaaggtgga caacgccctgcagtcggcaactcccaggaatccgtcaccgagcaggactccaaggactctacctactccctgtcctccacctgacc ctgtccaaggccgactacgagaagcaccaaggtgtacgcctgcgaagtgacccaccagggcctgtcatctccagtgactaagtttca accggggcgagtgc
15	MAVLGLLFCLVTFPSCVLS
16	MAPVQLLGLLVFLPAMRC

CLAIMS

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A binding compound that specifically binds human TSLP comprising a heavy chain variable region or a TSLP-binding fragment thereof, said heavy chain variable region comprising a CDR-H2 sequence comprising SEQ ID NO:2; and, optionally, a second therapeutic agent.
2. The binding compound of claim 1, further comprising:
 - (i) a CDR-H1 sequence comprising SEQ ID NO:1; and
 - (ii) a CDR-H3 sequence comprising SEQ ID NO:3.
3. The binding compound of claim 1, further comprising an antibody light chain variable region or a TSLP-binding fragment thereof.
4. The binding compound of claim 3, wherein said light chain variable region comprises:
 - (i) a CDR-L1 sequence comprising SEQ ID NO:4;
 - (ii) a CDR-L2 sequence comprising SEQ ID NO:5; and
 - (iii) a CDR-L3 sequence comprising SEQ ID NO:6.
5. A binding compound that specifically binds human TSLP, comprising a heavy chain variable region comprising a sequence selected from the group consisting of:
 - (i) SEQ ID NO: 7;
 - (ii) SEQ ID NO:7 or a variant thereof; and
 - (iii) a sequence having at least 97% homology to SEQ ID NO: 7.
6. The binding compound of claim 5, wherein said variant comprises up to 3 modified amino acid residues.
7. The binding compound of claim 5, wherein said heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:7.
8. The binding compound of claim 5, further comprising a light chain variable region.

9. The binding compound of claim 8, wherein said light chain variable region comprises a sequence selected from the group consisting of:
- (i) SEQ ID NO: 8;
 - (ii) SEQ ID NO:8 or a variant thereof; and
 - (iii) a sequence having at least 97% homology to SEQ ID NO: 8.
10. The binding compound of claim 8, wherein said light chain variable region comprises SEQ ID NO: 8.
11. An isolated nucleic acid encoding the heavy chain variable region of the binding compound of claim 1.
12. An expression vector comprising the nucleic acid of claim 11 operably linked to control sequences that are recognized by a host cell when the host cell is transfected with the vector.
13. A host cell comprising the expression vector of Claim 12.
14. A method of producing a polypeptide comprising:
- culturing the host cell of claim 13 in culture medium under conditions wherein the nucleic acid sequence is expressed, thereby producing polypeptides comprising the light and heavy chain variable regions; and
 - recovering the polypeptides from the host cell or culture medium.
15. The binding compound of claim 1, wherein the binding compound is a humanized antibody or a TSLP-binding fragment thereof.
16. The binding compound of claim 1, wherein the binding compound is a TSLP-binding antibody fragment selected from the group consisting of Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, and a diabody.
17. A method of suppressing an immune response in a human subject comprising administering to a subject in need thereof the binding compound of claim 1, or a TSLP-binding fragment thereof, in an amount effective to block the biological activity of TSLP.

18. The method of claim 17, wherein the immune response is an inflammatory response.
19. The method of claim 17, wherein the subject has a disorder selected from the group consisting of allergic rhinosinusitis, allergic asthma, allergic conjunctivitis, or atopic dermatitis.
20. The method of claim 17, wherein the subject has asthma.
21. A composition comprising the binding compound of claim 1 in combination with a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.
22. The binding compound of claim 1, wherein the binding compound blocks TSLP-mediated activity.
23. The binding compound of claim 1, wherein said binding compound is able to block the binding of TSLP to TSLPR in a cross-blocking assay.
24. The use of the binding compound of claim 1, or a TSLP-binding fragment thereof, for the preparation of a medicament to suppress an immune response.
25. The use of the binding compound of claim 1, or a TSLP-binding fragment thereof, for the preparation of a medicament to treat inflammation.
26. The use of the binding compound of claim 1, or a TSLP-binding fragment thereof, for the preparation of a medicament to treat allergic inflammation.
27. The use of the binding compound of claim 1, or a TSLP-binding fragment thereof, for the preparation of a medicament to treat allergic rhinosinusitis, allergic asthma, allergic conjunctivitis, or atopic dermatitis.
28. The use of the binding compound of claim 1, or a TSLP-binding fragment thereof, for the preparation of a medicament to treat asthma.

5

29. The binding compound of claim 1, wherein the binding compound is an antibody comprising SEQ ID NO:11 and SEQ ID NO:12.
30. The binding compound of claim 1, wherein the binding compound can be expressed from the vector deposited under ATCC Deposit No. PTA-10482.
31. The binding compound of claim 1, wherein the binding compound comprises a heavy chain that can be expressed from the vector deposited under ATCC Deposit No. PTA-10482.
32. The binding compound of claim 1, wherein the binding compound comprises a heavy chain variable region that can be expressed from the vector deposited under ATCC Deposit No. PTA-10482.
33. The binding compound of claim 1, wherein the binding compound comprises the CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 regions of the antibody expressed by the vector deposited under ATCC Deposit No. PTA-10482.
34. The isolated nucleic acid of claim 11, wherein said nucleic acid encodes the heavy chain variable region encoded by the vector deposited under ATCC Deposit No. PTA-10482.
35. The expression vector deposited under ATCC Deposit No. PTA-10482
36. A host cell comprising the expression vector of claim 35.
37. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 7, 8, 11 or 12.

Sequence 1 20 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYAMHWVRQAPGGLEWMGTFIPLLDTSDY
Sequence 2 1 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYAMHWVRQAPGGLEWMGTFIPLLDTSDY

Sequence 1 80 AQKFQGRVTMTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARMGVTHSYVMDAWGQGLTVTVSS
Sequence 2 61 NQNFKGRVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARMGVTHSYVMDAWGQGLTVTVSS
* * *****

Sequence 1 140 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
Sequence 2 121 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

Sequence 1 200 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
Sequence 2 181 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG

Sequence 1 260 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
Sequence 2 241 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN

Sequence 1 320 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
Sequence 2 301 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE

Sequence 1 380 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
Sequence 2 361 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW

Sequence 1 440 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Sequence 2 421 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG.1



38

Sequence_Listing
SEQUENCE LISTING

<110> SCHERING CORPORATION
<120> ENGINEERED ANTI-TSLP ANTIBODY
<130> BP2009.7093
<140>
<141>
<150> 61/297,008
<151> 2010-01-21
<150> 61/258,051
<151> 2009-11-04
<160> 16
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 1
Gly Tyr Ile Phe Thr Asp Tyr Ala Met His
1 5 10

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 2
Thr Phe Ile Pro Leu Leu Asp Thr Ser Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 3
Met Gly Val Thr His Ser Tyr Val Met Asp Ala
1 5 10

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 4

35

Sequence_Listing
Arg Ala Ser Gln Pro Ile Ser Ile Ser Val His
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

<210> 7
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

300

Sequence_Listing

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 9
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccctc cgtgaaggtg 60
tcctgcaagg cctccggcta catcttcacc gactacgcca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggacagg gcctggaatg gatgggcacc ttcattccctc tgctggacac ctctgactac 180
gcccagaaat tccagggcag agtgaccatg accgccgaca cctccacctc caccgcctac 240
atggaactgc ggtccctgag atccgacgac accgccgtgt actactgcgc ccggatgggc 300
gtgacacact cctacgtgat ggacgcttgg ggccagggca ccctgggtcac cgtgtcctcc 360

<210> 10
<211> 327
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 10
gagatcgtgc tgaccagtc ccctggcacc ctgtctctgt ctcccggcga gagagccacc 60
ctgtcctgcc gggcctccca gcctatctcc atctccgtgc actggatatca gcagaagcca 120
ggacaggccc ctcggtgct gatctacttc gcttctcagt ctatctctgg catccctgac 180
cggttctccg gctctggctc cggcaccgac ttcaccctga ccatctcccg gctggaacct 240
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag accttctccc tgccttacac cttcggccag 300
ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacg 327

29

Sequence_Listing

<210> 11
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 11
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 130 135 140

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

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

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

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

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

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

17

Sequence_Listing

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 12
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 12
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

21

Sequence_Listing

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13
<211> 1350
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 13
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccctc cgtgaagggtg 60
tcctgcaagg cctccggcta catcttcacc gactacgcca tgcactgggt cgcagggt 120
ccaggacagg gcctggaatg gatgggcacc ttcattccctc tgctggacac ctctgactac 180
gcccagaaat tccagggcag agtgaccatg accgccgaca cctccacctc caccgcctac 240
atggaactgc ggtccctgag atccgacgac accgccgtgt actactgcgc ccggatgggc 300
gtgacacact cctacgtgat ggacgcttg ggccagggca ccctggtcac cgtgtcctcc 360
gctagcacca agggcccttc cgtgttccct ctggccctt cctccaagtc tacctctggc 420
ggcaccgctg ctctgggctg tctggtaag gactacttcc ctgagcctgt gacagtctct 480
tggaactctg gcgccctgac ctccggcgctg cacaccttcc ctgccgtgct gcagtctagt 540
ggcctgtact ccctgtcctc cgtggtcaca gtgccttcat catccctggg caccagacc 600
tacatctgca acgtgaacca caagccttcc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagcct 660
aagtcctgcg acaagacca cacctgtcct ccatgccctg ccctgagct gctgggcgga 720
ccctccgtgt tcctgttccc tcctaagcct aaggacaccc tgatgatctc ccggaccct 780
gaagtgacct gcgtgggtgt ggacgtgtcc caccaggacc cagaagtga gttcaattgg 840
tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ctggggagga acagtacaac 900
tccacctacc ggggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 960
gaatacaagt gcaagggtgtc caacaaggcc ctgcctgccc ctatcgaaaa gaccatctcc 1020
aaggccaagg gccagccaag agaacctcag gtgtacaccc tgcctccctc tcgggacgag 1080

22

Sequence_Listing
ctgaccaaga accaggtgtc cctgacatgc ctggtcaagg gcttctaccc ttccgatatc 1140
gccgtggagt gggagtctaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac ccctcctgtg 1200
ctggactccg acggctcctt cttcctgtac tccaagctga ccgtggacaa gtcccgggtg 1260
cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1320
cagaagtccc tgtccctgtc tcctggcaag 1350

<210> 14
<211> 642
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 14
gagatcgtgc tgacccagtc ccctggcacc ctgtctctgt ctcccggcga gagagccacc 60
ctgtcctgcc gggcctccca gcctatctcc atctccgtgc actggtatca gcagaagcca 120
ggacaggccc ctcggtgct gatctacttc gcttctcagt ctatctctgg catccctgac 180
cggttctccg gctctggctc cggcaccgac ttcaccctga ccattctccg gctggaacct 240
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag accttctccc tgccttacac cttcggccag 300
ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gccgctcctt ccgtgttcat cttccctccc 360
tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tctgtcgtct gcctgctgaa caacttctac 420
cctcgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagtccgg caactcccag 480
gaatccgtca ccgagcagga ctccaaggac tctacctact ccctgtcctc caccctgacc 540
ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc 600
ctgtcatctc cagtgactaa gtctttcaac cggggcgagt gc 642

<210> 15
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

Val Leu Ser

<210> 16
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

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

Met Arg Cys



Sequence_Listing

29

ANTICUERPO ANTI-TSLP MODIFICADO POR TÉCNICAS DE INGENIERÍA GENÉTICA

Esta solicitud reclama el beneficio de la solicitud de patente provisoria Estadounidense no. 61/297.008; presentada el 21 de enero, 2010; y, solicitud de
5 patente provisoria Estadounidense no. 61/258.051; presentada el 4 de noviembre, 2009; cada una de las cuales se incorpora a la presente como referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere, en general, a un anticuerpo específico
10 para la linfopoyetina estromal tímica (TSLP, siglas correspondientes a "thymic stromal lymphopoietin"), y sus usos, particularmente en trastornos inflamatorios e inflamatorios alérgicos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La TSLP es una citoquina inmune que induce respuestas de células T
15 CD4⁺ mediadas por células dendríticas con un fenotipo proalergénico DC activado por TSLP que juega un rol crucial en la inducción y mantenimiento de respuestas de células cebadas y Th2 inflamatorias alérgicas mediante la producción de citoquinas proalergénicas, quimioquinas y moléculas co-estimuladoras que dirigen a las células T naïve para volverse células Th2, produciendo mediadores críticos
20 de IL-4, IL-5 y IL-13 de inflamación alérgica. La sobreexpresión de TSLP en la Dermatitis Atópica (DA), Síndrome de Netherton y el Asma indica un rol crucial de esta citoquina en la patogénesis de estas enfermedades inflamatorias alérgicas. Esto es respaldado por modelos animales en los cuales la sobreexpresión transgénica de TSLP en piel o pulmón así como también la
25 remoción mediante direccionamiento (gene targeting) genético de reguladores negativos de TSLP da como resultado enfermedades inflamatorias alérgicas que se asemejan cercanamente a la dermatitis atópica humana o el Asma. La

presente invención provee anticuerpos contra TSLP modificados por técnicas de ingeniería genética y usos de los mismos para tratar trastornos inflamatorios, y particularmente trastornos inflamatorios alérgicos, incluyendo asma y dermatitis atópica.

5 La presente invención evita potenciales problemas de desamidación de los anticuerpos de la técnica anterior. La desamidación de residuos Asn (N) es una degradación común de las proteínas, y puede impactar significativamente sobre la estructura y función proteica. En los anticuerpos, Asn (N) situado en las CDRs puede sufrir desamidación rápidamente y puede dar como resultado cambios en
10 interacciones anticuerpo- antígeno y, por lo tanto, representa una seria preocupación durante el desarrollo de agentes terapéuticos basados en anticuerpos. Véase, por ej., Vlaska et al., *Analytical Biochemistry* 392:145-154 (2009). Por consiguiente, es importante evitar estos potenciales problemas de desamidación en anticuerpos que tienen el propósito de ser desarrollados para
15 uso humano. Por añadidura, es importante evitar estos problemas sin cambiar ninguna de las características importantes (tales como afinidad de unión) del anticuerpo.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

20 La presente invención proporciona un compuesto de unión que se une específicamente a TSLP humana, que comprende por lo menos una región variable de cadena pesada de anticuerpo, o su fragmento de unión a TSLP, dicha región variable de cadena pesada comprende SEC ID NO:2

 La presente invención proporciona además un compuesto de unión que se
25 une específicamente a TSLP humana que comprende por lo menos una región variable de cadena pesada de anticuerpo, o su fragmento de unión a TSLP,

comprendiendo dicha región variable de cadena pesada por lo menos SEC ID NO:2 y SEC ID NO:1, o SEC ID NO:2 y SEC ID NO:3.

La presente invención proporciona además un compuesto de unión que se une específicamente a TSLP humana que comprende por lo menos una región variable de cadena pesada de anticuerpo, o su fragmento de unión a TSLP, comprendiendo dicha región variable de cadena pesada SEC ID NO: 1, SEC ID NO:2, y SEC ID NO:3.

Los compuestos de unión de la invención podrían comprender además una región variable de cadena ligera del anticuerpo, o su fragmento de unión a TSLP.

10 En una realización, la región variable de cadena ligera del anticuerpo, o su fragmento de unión a TSLP, comprende por lo menos una secuencia seleccionada del grupo formado por SEC ID NOs: 4, 5 y 6. En otra realización, la región variable de cadena ligera del anticuerpo, o su fragmento de unión a TSLP, comprende por lo menos dos secuencias seleccionadas del grupo formado por

15 SEC ID NOs: 4, 5 y 6. En otras realizaciones, la región variable de cadena ligera del anticuerpo, o su fragmento de unión a TSLP, tiene las tres secuencias expuestas en SEC ID NOs: 4, 5 y 6.

En algunas realizaciones de los compuestos de unión descritos anteriormente, la totalidad o sustancialmente la totalidad del resto de la región variable de cadena pesada es la totalidad o sustancialmente la totalidad de una región de Ig humana; y la totalidad o sustancialmente la totalidad del resto de la región variable de cadena ligera es la totalidad o sustancialmente la totalidad de una región de Ig humana. En realizaciones preferidas, el resto de la región variable de cadena pesada es una secuencia de aminoácidos de cadena pesada

20 humana; y el resto de la región variable de cadena ligera es la secuencia de aminoácidos de cadena ligera humana.

25

La presente invención también provee un compuesto de unión que se une específicamente a TSLP humana, que comprende: una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por: (i) SEC ID NO: 7; (ii) SEC ID NO:7 o una variante que comprende hasta 3 residuos de aminoácidos modificados; y (iii) una secuencia que tiene por lo menos 97% de homología con SEC ID NO: 7. En una realización, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia mostrada en SEC ID NO:7. En algunas realizaciones, el compuesto de unión de la invención comprende además una región variable de cadena ligera. En una realización, la región variable de cadena ligera comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por: (i) SEC ID NO: 8; (ii) SEC ID NO:8 o una variante que comprende hasta 3 residuos de aminoácidos modificados; y (iii) una secuencia que tiene por lo menos 97% de homología con SEC ID NO: 8. En una realización, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia mostrada en SEC ID NO:8.

En una realización preferida, el compuesto de unión comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia mostrada en SEC ID NO:7 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia mostrada en SEC ID NO:8.

En algunas realizaciones, los compuestos de unión de la invención comprenden además una región constante de cadena pesada y/o una región constante de cadena ligera. En alguna realización, la región constante de cadena pesada comprende una región constante de cadena pesada humana $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, o $\gamma 4$ o una variante de la misma. En otras realizaciones, la región constante de cadena ligera comprende una región constante de cadena ligera humana λ o κ .

En algunas realizaciones, el compuesto de unión de la invención es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En diversas

A6

realizaciones, el anticuerpo o su fragmento de la presente invención es policlonal, monoclonal, quimérico, "cyno-ized" (cino-izado), humanizado o completamente humano. En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.

- 5 La presente invención contempla además que el fragmento de unión es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo formado por Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, y un diacuerpo. La presente invención contempla además que el compuesto de unión es un nanocuerpo, un avímero o un aptímero.

En una realización, el compuesto de unión es un anticuerpo que
10 comprende una cadena pesada que comprende SEC ID NO:11. En una realización, el compuesto de unión comprende una cadena pesada que comprende SEC ID NO:11 y una cadena ligera que comprende SEC ID NO:12.

En otra realización preferida, el compuesto de unión de la invención une TSLP humana y cyno.

- 15 En una realización, el compuesto de unión de la invención puede ser expresado del vector de expresión depositado con N° de Depósito en ATCC: PTA-10482.

En otra realización, el compuesto de unión de la invención comprende una cadena pesada y una cadena ligera que pueden ser expresadas del vector de
20 expresión depositado bajo N° de Depósito de ATCC: PTA-10482. En otra realización, el compuesto de unión de la invención comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que pueden ser expresadas a partir del vector de expresión depositado bajo el N° de Depósito de ATCC: PTA-10482. En otra realización, el compuesto de unión de la invención
25 comprende las regiones CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 y las regiones CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del anticuerpo expresado por el vector de expresión depositado bajo N° de Depósito de ATCC: PTA-10482.

En otra realización, el compuesto de unión de la invención comprende una cadena pesada que puede ser expresada del vector de expresión depositado bajo el N° de Depósito de ATCC: PTA-10482. En otra realización, el compuesto de unión de la invención comprende una región variable de cadena pesada que
5 puede ser expresado del vector de expresión depositado bajo N° de Depósito de ATCC: PTA-10482. En otra realización, el compuesto de unión de la invención comprende las regiones CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del anticuerpo expresadas por el vector de expresión depositado bajo N° de Depósito de ATCC: PTA-10482.

La presente invención proporciona además ácidos nucleicos aislados que
10 codifican el compuesto de unión de la invención. En una realización, la invención comprende un ácido nucleico que codifica una región variable de cadena pesada de un compuesto de unión (por ejemplo un anticuerpo o fragmento de anticuerpo) de la invención. En otra realización, la invención comprende un ácido nucleico que codifica un compuesto de unión que comprende una región variable de
15 cadena pesada, donde dicha región variable de cadena pesada comprende SEC ID NO:1, SEC ID NO:2 y SEC ID NO:3. En otra realización, la invención comprende un ácido nucleico que codifica SEC ID NO:7. En otra realización, la invención comprende un ácido nucleico que codifica SEC ID NO:2. En una
realización, la invención comprende un ácido nucleico que codifica la región
20 variable de cadena pesada codificada por el vector de expresión depositado bajo N° de Depósito de ATCC: PTA-10482. La invención provee además vectores de expresión que comprenden los ácidos nucleicos de la invención ligados operativamente a secuencias controles que son reconocidas por una célula huésped cuando la célula huésped es transfectada con el vector. En una
25 realización, la invención proporciona el vector de expresión depositado bajo el N° de Depósito de ATCC: PTA-10482. También se proveen células huéspedes que comprenden estos vectores de expresión, y métodos para utilizar estos vectores

de expresión para producir polipéptidos. En una realización, la célula huésped comprende el vector de expresión depositado bajo el N° de Depósito de ATCC PTA-10482. Los métodos para producir polipéptido comprenden los pasos de: cultivar la célula huésped en medio de cultivo bajo condiciones donde la
5 secuencia de ácido nucleico es expresada, produciendo de ese modo polipéptidos que comprende las regiones variables de cadena ligera y pesada; y recuperar los polipéptidos de la célula huésped o medio de cultivo. En una realización, la invención comprende un método para producir un polipéptido que comprende los pasos de: cultivar una célula huésped que comprende el vector de
10 expresión depositado bajo el N° de Depósito de ATCC PTA-10482 en medio de cultivo bajo condiciones donde el vector es expresado, produciendo de ese modo polipéptidos que comprenden regiones variables de cadena ligera y pesada; y recuperar los polipéptidos de la célula huésped o medio de cultivo.

La presente invención abarca un método para suprimir una respuesta
15 inmune en un sujeto humano que comprende administrar a un sujeto que lo necesita un compuesto de unión de acuerdo con la invención que se une específicamente a TSLP humana, en una cantidad eficaz para bloquear la actividad biológica de TSLP. La presente invención contempla además administrar un agente inmunosupresivo o antiinflamatorio adicional. En una
20 realización preferida, la respuesta inmune es asma. En otra realización preferida, la respuesta inmune es inflamación alérgica. En otra realización preferida, la inflamación alérgica es rinosinusitis alérgica, asma alérgica, conjuntivitis alérgica, o dermatitis atópica. En otra realización preferida, la respuesta inmune es fibrosis, enfermedad intestinal inflamatoria o linfoma de Hodgkin. En otra realización
25 preferida, el compuesto de unión es administrado en combinación con otro agente inmunomodulador.

El compuesto de unión de la presente invención puede estar en una composición que comprende el compuesto de unión de la invención (por ejemplo un anticuerpo o un fragmento del mismo) en combinación con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. En una realización adicional, la
5 composición comprende además un agente inmunosupresivo o antiinflamatorio.

En diversas realizaciones, la invención se refiere a medicamentos que comprenden el compuesto de unión (por ejemplo un anticuerpo o fragmento del mismo) de la presente invención. Por ejemplo, la invención abarca el uso de un
10 compuesto de unión que se une específicamente a TSLP humana para la preparación de un medicamento para suprimir una respuesta inmune. La presente invención abarca el uso de un compuesto de unión que se une específicamente a TSLP humana (por ejemplo, cualquiera de los compuestos de unión de acuerdo con la invención) para la preparación de un medicamento para tratar el asma. La presente invención abarca el uso de un compuesto de unión
15 que se une específicamente a TSLP humana para la preparación de un medicamento para tratar un trastorno inflamatorio. En una realización, el trastorno inflamatorio es un trastorno inflamatorio alérgico. En una realización, el trastorno inflamatorio alérgico es rinosinusitis alérgica, asma alérgica, conjuntivitis alérgica, o dermatitis atópica. En una realización preferida, el trastorno
20 inflamatorio alérgico es asma alérgica. En otra realización preferida, el trastorno inflamatorio alérgico es dermatitis atópica. Por ejemplo, los anticuerpos y fragmento de la presente invención pueden utilizarse para tratar seres humanos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Como se utilizan en esta invención, incluyendo las reivindicaciones
25 adjuntas, las formas singulares de palabras tales como “un”, “una” y “el”, “la”, incluyen sus correspondientes referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Todas las referencias citadas en esta invención



son incorporadas a modo de referencia en la misma medida como si cada publicación, solicitud de patente o patente individual fuese específica e individualmente indicada como estando incorporada por referencia.

I. Definiciones

5 “Activación”, “estimulación” y “tratamiento” cuando se aplican a células o a receptores, pueden tener el mismo significado, por ej., activación, estimulación o tratamiento de una célula o receptor con un ligando, a menos que se indique lo contrario por el contexto o explícitamente. “Ligando” abarca ligandos naturales y sintéticos, por ej., citoquinas, variantes de citoquinas, análogos, muteínas, y
10 composiciones de unión derivadas de anticuerpos. “Ligando” también abarca moléculas pequeñas, por ej., miméticos peptídicos de citoquinas y miméticos peptídicos de anticuerpos. “Activación” puede hacer referencia a la activación celular según lo regulado por mecanismos internos así como también por factores externos o medioambientales. “Respuesta”, por ej. de una célula, tejido, órgano u
15 organismo, abarca un cambio en el comportamiento bioquímico o fisiológico, por ej., concentración, densidad, adhesión o migración dentro de un compartimiento biológico, índice de expresión génica, o estado de diferenciación, donde el cambio está correlacionado con activación, estimulación, o tratamiento, o con mecanismos internos tales como programación genética.

20 “Actividad” de una molécula puede describir o hacer referencia a la unión de la molécula a un ligando o a un receptor, a actividad catalítica; a la capacidad de estimular la expresión genética o señalización, diferenciación, o maduración celular; a actividad antigénica, a la modulación de actividades de otras moléculas, y similares. “Actividad” también puede significar actividad específica, por ej.,
25 [actividad catalítica]/[mg de proteína], o [actividad inmunológica]/[mg de proteína], concentración en un compartimiento biológico o similares.

“Administración” y “tratamiento,” cuando se aplican a un animal, humano, sujeto experimental, célula, tejido, órgano, o fluido biológico, se refiere al contacto de un agente farmacéutico, terapéutico, de diagnóstico exógeno, o composición al animal, humano, sujeto, célula, tejido, órgano o fluido biológico. “Administración” y “tratamiento” pueden hacer referencia, por ej., a métodos terapéuticos, farmacocinéticos, de diagnóstico, investigación y experimentales. El tratamiento de una célula abarca el contacto de un reactivo a la célula, así como también el contacto de un reactivo con un fluido, donde el fluido está en contacto con la célula. “Administración” y “tratamiento” también significan tratamientos *in vitro* y *ex vivo*, por ej., de una célula, mediante un reactivo, composición de diagnóstico, composición de unión, o mediante otra célula. “Tratamiento,” cuando se aplica a un ser humano, veterinario, o sujeto de investigación, se refiere al tratamiento terapéutico, medidas profilácticas o preventivas, a aplicaciones de investigación y diagnóstico.

“Compuesto de unión” se refiere a una molécula que comprende una o más secuencias de aminoácidos que se unen específicamente a TSLP humana. En una realización preferida, el compuesto de unión es un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo aislado. En otra realización preferida, el compuesto de unión comprende un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo.

“Composición de unión” se refiere a un compuesto de unión a TSLP en combinación con un estabilizante, excipiente, sal, buffer, solvente, o aditivo, capaz de unión a un objetivo.

El alcance de la presente invención también incluye complejos que comprenden cualquier anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno de la presente invención en complejo con polipéptido TSLP o su fragmento antigénico.

89

Los complejos pueden ser preparados poniendo en contacto el anticuerpo o fragmento con el polipéptido de TSLP o fragmento del antígeno.

Como se emplea en esta invención, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que exhibe la actividad biológica deseada. Por consiguiente, se emplea en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ej., anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada. "Anticuerpo aislado" se refiere al estado de purificación de un compuesto de unión y en dicho contexto significa que la molécula está sustancialmente libre de otras moléculas biológicas tales como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, carbohidratos, u otro material tal como resto celular y medio de crecimiento. En general, el término "aislado" no tiene el propósito de hacer referencia a una ausencia completa de dicho material o a una ausencia de agua, buffers, o sales, a menos que estén presentes en cantidades que interfieran sustancialmente con el uso experimental o terapéutico del compuesto de unión según lo descrito en esta invención.

Un "fragmento Fab" está compuesto por una cadena ligera y la CH1 y regiones variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

Una región "Fc" contiene dos fragmentos de cadena pesada que comprenden los dominios CH2 y CH3 de un anticuerpo. Los dos fragmentos de cadena pesada se sostienen juntos por dos o más enlaces disulfuro y por interacciones hidrófobas de los dominios CH3.

Un "fragmento Fab' " contiene una cadena ligera y una porción o fragmento de una cadena pesada que contiene el dominio VH y el dominio CH1 y también la región entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se puede formar

un enlace disulfuro entre cadenas entre las dos cadenas pesadas de dos fragmentos Fab' para formar una molécula F(ab')₂.

Un "fragmento F(ab')₂" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios CH1 y CH2, de modo que se forma un enlace disulfuro entre cadenas entre las dos cadenas pesadas. Un fragmento F(ab')₂ por ende, está compuesto por dos fragmentos Fab' que están sostenidos entre sí por un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas.

La "región Fv" comprende las regiones variables de tanto las cadenas pesada como ligera, pero carece de las regiones constantes.

Como se emplea en esta invención, el término "fragmento de unión a TSLP" o "su fragmento de unión" abarca un fragmento o un derivado de un anticuerpo (u otra sustancia de unión) que aun retiene sustancialmente su actividad biológica de inhibir la actividad de TSLP. Por lo tanto, el término "fragmento de anticuerpo" o fragmento de unión a TSLP se refiere a una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la unión al antígeno o región variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única, por ej., sc-Fv; anticuerpos de dominio; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo. Típicamente, un fragmento de unión o derivado retiene por lo menos 10% de su actividad inhibidora de TSLP. Preferentemente, un fragmento de unión o derivado retiene por lo menos 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o 100% (o más) de su actividad inhibidora de TSLP, si bien cualquier fragmento de unión con suficiente afinidad para ejercer el efecto biológico deseado será útil. También se pretende que un fragmento de unión a TSLP pueda incluir sustituciones de aminoácidos conservadoras que no alteran sustancialmente su actividad biológica.

El término "anticuerpo monoclonal", como se emplea en esta invención, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de presentación natural que puedan estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos contra un único epítipo antigénico. En contraste, las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales típicamente incluyen una multitud de anticuerpos dirigidos contra (o específicos para) diferentes epítopes. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como es obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como requiriendo la producción del anticuerpo por ningún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a ser empleados de acuerdo con la presente invención pueden ser preparados mediante el método del hibridoma primero descrito por Kohler et al., (1975) *Nature* 256: 495, o pueden ser preparados mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ej. la Pat. Estadounidense No. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden ser aislados de genotecas de anticuerpos en fagos empleando las técnicas descritas en Clackson et al., (1991) *Nature* 352: 624-628 y Marks et al., (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie en particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que el resto de la o las cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a

otra clase o subclase de anticuerpo, así como también fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando los mismos exhiban la actividad biológica deseada (Pat. Estadounidense No. 4.816.567; y Morrison et al., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855).

5 Un "anticuerpo de dominio" es un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que contiene solamente la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. En algunos casos, dos o más regiones V_H están unidas covalentemente con un ligante peptídico para crear un anticuerpo de dominio bivalente. Las dos regiones V_H de un anticuerpo
10 de dominio bivalente pueden dirigirse hacia los mismos antígenos o hacia antígenos diferentes.

Un "anticuerpo bivalente" comprende dos sitios de unión al antígeno. En algunos casos, los dos sitios de unión tienen las mismas especificidades de antígeno. Sin embargo, los anticuerpos bivalentes pueden ser biespecíficos.

15 Como se emplea en esta invención, el término "Fv de cadena única" o anticuerpo "scFv" se refiere a fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica. En general, el polipéptido Fv comprende además un ligante polipeptídico entre los dominios V_H y V_L lo cual permite que el sFv forme la
20 estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun (1994) *THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención también incluyen anticuerpos de dominio único camelizados. Ver, por ej., Muyldermans et al. (2001)
25 *Trends Biochem. Sci.* 26:230; Reichmann et al. (1999) *J. Immunol. Methods* 231:25; WO 94/04678; WO 94/25591; Pat. Estadounidense No. 6.005.079, incorporadas a la presente como referencia en sus totalidades). En una

realización, la presente invención proporciona anticuerpos de dominio único que comprenden dos dominios V_H con modificaciones de modo que se formen anticuerpos de dominio único.

Como se emplea en esta invención, el término "diacuerpos" se refiere a
5 fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión al antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H - V_L or V_L - V_H). Mediante el uso de un ligante que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena,
10 los dominios son forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos son descritos más completamente en , por ej., EP 404,097; WO 93/11161; y Holliger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448. Para una revisión de variantes de anticuerpos modificados por técnicas de bioingeniería genética generalmente
15 véase Holliger y Hudson (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1126-1136.

Como se emplea en esta invención, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ej., murinos) así como también anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no
20 humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente la totalidad de los lazos hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones FR son aquellas de una secuencia de
25 inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. El

prefijo “h”, “hu” o “hum” es agregado a designaciones de clones de anticuerpos cuando es necesario distinguir anticuerpos humanizados (por ej., “hu23B12”) de anticuerpos de roedor parentales (por ej., 23B12 de rata, o “r23B12”). Las formas humanizadas de anticuerpos de roedor generalmente comprenderán las mismas
5 secuencias de CDR de los anticuerpos de roedor parentales, si bien ciertas sustituciones de aminoácidos pueden ser incluidas para aumentar la afinidad o aumentar la estabilidad del anticuerpo humanizado.

Los anticuerpos de la presente invención también incluyen anticuerpos con regiones Fc modificadas (o bloqueadas) para proporcionar funciones efectoras
10 alteradas. Ver, por ej., Pat. Estadounidense No. 5.624.821; WO2003/086310; WO2005/120571; WO2006/0057702; Presta (2006) *Adv. Drug Delivery Rev.* 58:640-656. Ese tipo de modificación puede ser empleada para aumentar o suprimir las diversas reacciones del sistema inmune, con posibles efectos beneficiosos en el diagnóstico y la terapia. Las alteraciones de la región de Fc
15 incluyen cambios de aminoácidos (sustituciones, deleciones e inserciones), glicosilación o desglicosilación, y agregado de múltiples Fc. Los cambios a Fc también pueden alterar la vida media de anticuerpos en anticuerpos terapéuticos, y una vida media más larga daría como resultado dosificaciones menos frecuentes, con la concomitante conveniencia aumentada y uso disminuido de
20 material. Ver Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731 en 734-35.

El término “anticuerpo completamente humano” se refiere a un anticuerpo que comprende secuencias de proteína inmunoglobulina humana solamente. Un anticuerpo completamente humano puede contener cadenas de carbohidratos murinas si es producido en un ratón, en una célula de ratón, o en un hibridoma
25 derivado de una célula de ratón. Similarmente, “anticuerpo de ratón” se refiere a un anticuerpo el cual comprende secuencias de inmunoglobulina de ratón solamente.

Como se emplea en esta invención, el término "región hipervariable" se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ej. residuos 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) y 89-97 (CDRL3) en el dominio variable de cadena ligera y los residuos 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) y 95-102 (CDRH3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) y/o aquellos residuos de un "lazo hipervariable" (es decir, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917). Como se emplea en esta invención, el término residuos de "estructura" ("framework") o "FR" se refiere a aquellos residuos de dominio variable que no son los residuos de región hipervariable definidos en esta invención como residuos de CDR. La numeración de residuos que antecede se refiere al sistema de numeración Kabat y no necesariamente corresponde en detalle a la numeración de secuencias en el Listado de Secuencias acompañantes.

"Unión" se refiere a una asociación de la composición de unión con un objetivo donde la asociación da como resultado una reducción en el movimiento browniano de la composición de unión, en los casos en donde la composición de unión puede ser disuelta o suspendida en solución.

"Variantes conservativamente modificadas" o "sustitución conservadora" se refiere a las sustituciones de aminoácidos como son conocidas por los expertos en esta técnica y pueden realizarse generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en la técnica reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácido único en regiones no esenciales de un

polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ej., Watson, *et al.*, *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4ta Edición 1987)). Dichas sustituciones ejemplares son preferentemente realizadas de acuerdo con lo expuesto en la Tabla 1 que aparece a continuación:

5

Tabla 1
Sustituciones de Aminoácidos Conservadoras Ejemplares

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

“Cantidad eficaz” abarca una cantidad suficiente para mejorar o prevenir un
10 síntoma o signo de la condición médica. Cantidad eficaz también significa una cantidad suficiente para permitir o facilitar el diagnóstico. Una cantidad eficaz para un paciente en particular o sujeto veterinario puede variar dependiendo de

factores tales como la afección que se está tratando, la salud en general del paciente, la ruta del método y dosis de administración y la severidad de los efectos colaterales (véase, por ej., Pat. Estadounidense No. 5.888.530 concedida a Netti, *et al.*). Una cantidad eficaz puede ser la dosis máxima o protocolo de dosificación que evita efectos colaterales o efectos tóxicos significativos. El efecto dará como resultado una mejora de una medida o parámetro de diagnóstico en al menos 5%, generalmente en al menos 10%, más usualmente al menos 20%, más usualmente al menos 30%, preferentemente por lo menos 40%, más preferentemente por lo menos 50%, con máxima preferencia por lo menos 60%, idealmente por lo menos 70%, más idealmente por lo menos 80%, y más idealmente por lo menos 90%, donde 100% es definido como el parámetro de diagnóstico mostrado por un sujeto normal (ver, por ej., Maynard, *et al.* (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., Londres, Reino Unido).

Como se emplea en esta invención, el término "molécula de ácido nucleico aislada" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es identificada y separada de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la cual es asociada comúnmente en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada es diferente en la forma o entorno en la cual es encontrada en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico del modo en que existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan comúnmente el anticuerpo donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosómica diferente de aquella de las células naturales.

La expresión "secuencias controles" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante ligada operativamente en un organismo huésped en particular. Las secuencias controles que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operador, y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucarióticas utilizan promotores, señales de poliadenilación y mejoradores.

Un ácido nucleico está "ligado operativamente" cuando es colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretorio está ligado operativamente a ADN para un polipéptido si es expresado como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o mejorador está ligado operativamente a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está ligado operativamente a una secuencia codificante, si está posicionada de modo de facilitar la traducción. En general, "ligado operativamente" significa que las secuencias de ADN que está ligadas son contiguas, y en el caso de un líder secretorio, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los mejoradores no tienen que ser contiguos. La unión se logra mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o ligantes oligonucleotídicos sintéticos se utilizan de acuerdo con la práctica convencional.

Como se emplean en esta invención, las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular" se emplean indistintamente y todas esas designaciones incluyen a la progenie. Por lo tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y cultivos derivados de los mismos sin importar la cantidad de transferencias. Se entiende además que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en el contenido del ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluyen las progenies mutante que

15a

tienen la misma función o actividad biológica como se seleccionan en la célula originalmente transformada. Donde se pretenden designaciones distintas, será claro a partir del contexto.

Como se emplea en esta invención, "reacción en cadena de polimerasa" o "PCR" se refiere a un procedimiento o técnica en la cual cantidades diminutas de un pedazo específico de ácido nucleico, ARN y/o ADN, se amplifican según lo descrito en, por ej. la Pat. estadounidense No. 4.683.195. En general, la información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá debe estar disponible, de modo que los cebadores oligonucleotídicos puedan ser diseñados; estos cebadores serán idénticos o similares en secuencia a hebras opuestas de patrón a ser amplificado. Los nucleótidos de terminal 5' de los dos cebadores pueden coincidir con los extremos del material amplificado. La PCR puede ser empleada para amplificar secuencias de ARN específicas, secuencias de ADN específicas de ADN genómico total, y ADNc transcripto de ARN celular total, bacteriófago o secuencias de plásmido, etc. Ver generalmente Mullis et al. (1987) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263; Erlich, ed., (1989) *PCR TECHNOLOGY* (Stockton Press, N.Y.) Como se emplea en esta invención, PCR se considera que es un ejemplo, pero no el único, de un método de reacción de polimerasa de ácido nucleico para amplificar una muestra de ensayo de ácido nucleico que comprende el uso de un ácido nucleico conocido como un cebador y una polimerasa de ácido nucleico para amplificar o generar un pedazo específico de ácido nucleico.

Como se emplea en esta invención, el término "secuencia de línea germinal" se refiere a una secuencia de secuencias de ADN de inmunoglobulina no reordenadas. Puede emplearse cualquier fuente adecuada de ADN de inmunoglobulina no reordenado.

“Inhibidores” con compuestos que disminuyen, bloquean, previenen, retardan la activación, inactivan, desensibilizan, o regulan hacia abajo, por ej., un gen, proteína, ligando, receptor o célula. Un inhibidor también puede ser definido como una composición que reduce, bloquea o inactiva una actividad constitutiva.

- 5 Un “antagonista” es un compuesto que se opone a las acciones de un agonista. Un antagonista previene, reduce, inhibe, o neutraliza la actividad de un agonista. Un antagonista también puede prevenir, inhibir, o reducir la actividad constitutiva de un objetivo, por ej. un receptor objetivo, incluso donde no hay agonista identificado.

- 10 Para examinar el grado de inhibición, por ejemplo, las muestras o ensayos que comprenden una proteína, gen, célula u organismo, por ejemplo, dado, se tratan con un agente activador o inhibidor potencial y se comparan con muestras controles sin el agente. Las muestras controles, es decir, no tratadas con agente, son asignadas un valor de actividad relativo de 100%. La inhibición se logra
- 15 cuando el valor de actividad relativo al control es aproximadamente 90% o menos, típicamente 85% o inferior, más típicamente 80% o inferior, más típicamente 75% o inferior, generalmente 70% o inferior, más generalmente 65% o inferior, más generalmente 60% o inferior, típicamente 55% o inferior, usualmente 50% o inferior, más usualmente 45% o inferior, más usualmente 40%
- 20 o inferior, preferentemente 35% o inferior, más preferentemente 30% o inferior, aun más preferentemente 25% o inferior, y con máxima preferencia menos del 25%.

- Los criterios de valoración en la inhibición pueden ser monitoreados de la siguiente manera. La inhibición, y respuesta al tratamiento, por ej., de una célula,
- 25 fluido fisiológico, tejido, órgano, y sujeto animal o humano, se pueden monitorear por un criterio de valoración. El criterio de valoración puede comprender una cantidad predeterminada o porcentaje de, por ej., un indicio de inflamación,



oncogenicidad, o degranulación celular o secreción, tal como la liberación de una citoquina, oxígeno tóxico o una proteasa. El criterio de valoración puede comprender, por ej., una cantidad predeterminada de flujo o transporte de iones; migración celular; adhesión celular; proliferación celular; potencial para
5 metástasis; diferenciación celular; y cambio en fenotipo, por ej., cambio en la expresión de gen con relación a la inflamación, apoptosis, transformación, ciclo celular, o metástasis (ver, por ej., Knight (2000) *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30:145-158; Hood y Cheresch (2002) *Nature Rev. Cancer* 2:91-100; Timme, et al. (2003) *Curr. Drug Targets* 4:251-261; Robbins y Itzkowitz (2002) *Med. Clin. North Am.*
10 86:1467-1495; Grady y Markowitz (2002) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3:101-128; Bauer, et al. (2001) *Glia* 36:235-243; Stanimirovic y Satoh (2000) *Brain Pathol.* 10:113-126).

Un criterio de valoración de inhibición es generalmente 75% del control o inferior, preferentemente 50% del control o inferior, más preferentemente 25% del
15 control o inferior, y con máxima preferencia 10% del control o inferior. En general, un criterio de valoración de activación es por lo menos 150% del control, preferentemente por lo menos dos veces el control, más preferentemente por lo menos cuatro veces el control, y con máxima preferencia por lo menos 10 veces el control.

20 Se une “específicamente” o “selectivamente”, cuando se refiere a un ligando/ receptor, anticuerpo/ antígeno, o a otro par de unión, indica una reacción de unión la cual es determinante de la presencia de la proteína, por ej., TSLP, en una población heterogénea de proteínas y/u otros materiales biológicos. Por lo tanto, bajo condiciones designadas, un ligando/ antígeno especificado se une a
25 un receptor/ anticuerpo en particular y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra.

El anticuerpo, o composición de unión derivado del sitio de unión al antígeno de un anticuerpo, del método contemplado se une a su antígeno con una afinidad que es por lo menos diez veces superior, más preferentemente por lo menos 20 veces superior, y con máxima preferencia por lo menos 50 veces superior que la afinidad con antígenos no relacionados. En una realización preferida, el anticuerpo tendrá una afinidad que es superior a aproximadamente 10^9 litros/mol, según lo determinado, por ej., por análisis de Scatchard (Munsen, *et al.* (1980) *Analyt. Biochem.* 107:220-239).

Como se emplea en esta invención, el término “trastorno inflamatorio” se refiere a cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por inflamación local en un sitio de lesión o infección e incluye, sin limitación, inflamación alérgica, enfermedades autoinmunes, y otros trastornos caracterizados por la acumulación celular inmune no deseada en un sitio de tejido local.

Como se emplea en esta invención, el término “agente inmunomodulador” se refiere a agentes naturales o sintéticos que suprimen o modulan una respuesta inmune. La respuesta inmune puede ser una respuesta humoral o celular. Los agentes inmunomoduladores abarcan agentes inmunosupresivos o antiinflamatorios.

“Agentes inmunosupresivos”, “drogas inmunosupresivas” o “inmunosupresores” como se utilizan en esta invención son agentes terapéuticos que se emplean en terapia inmunosupresiva para inhibir o prevenir la actividad del sistema inmune. Clínicamente, se emplean para prevenir el rechazo de órganos y tejidos trasplantados (por ej. médula ósea, corazón, riñón, hígado).y/o en el tratamiento de enfermedades autoinmunes o enfermedades que son más probablemente de origen autoinmune (por ej., artritis reumatoide, miastenia gravis, lupus sistémico eritematoso, colitis ulcerativa, esclerosis múltiple). Las drogas inmunosupresivas pueden ser clasificadas en cuatro grupos:

5

glucocorticoides, citostáticos; anticuerpos (incluyendo Modificadores de la Respuesta Biológica o DMARDs); drogas que actúan en inmunofilinas; otras drogas, incluyendo agentes quimioterapéuticos conocidos empleados en el tratamiento de trastornos proliferativos. Para la esclerosis múltiple, en particular,

5 los anticuerpos de la presente invención pueden ser administrados en conjunto con una nueva clase de agentes terapéuticos del tipo proteína de unión a mielina, conocidos como copaxones.

“Agentes antiinflamatorios” o “drogas antiinflamatorias”, se utiliza para representar tanto agentes terapéuticos esteroidales como no esteroidales. Los

10 esteroides, también conocidos como corticosteroides, son drogas que se asemejan estrechamente al cortisol, una hormona producida naturalmente por las glándulas adrenales. Los esteroides son empleados como el tratamiento principal para ciertas afecciones inflamatorias, tales como: Vasculitis sistémica (inflamación de vasos sanguíneos); y Miositis (inflamación del músculo). Los

15 esteroides también podrían ser empleados selectivamente para tratar afecciones inflamatorias tales como: artritis reumatoide (artritis inflamatoria crónica que se produce en articulaciones en ambos lados del cuerpo); lupus sistémico eritematoso (una enfermedad generalizada causada por la función del sistema inmune anormal); síndrome de Sjögren (trastorno crónico que causa sequedad

20 ocular y sequedad bucal).

Las drogas antiinflamatorias no esteroidales, generalmente abreviadas AINES, son drogas con efectos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios, que reducen el dolor, la fiebre y la inflamación. El término “no esteroides” se emplea para distinguir a estas drogas de los esteroides, los cuales (entre un amplio rango

25 de otros efectos) tienen una acción antiinflamatoria, depresora de eicosanoides similar. Las AINEs son generalmente indicadas para el alivio sintomático de las siguientes afecciones: artritis reumatoide; osteoartritis; artropatías inflamatorias

(por ej., espondilitis anquilosante, artritis soriática, síndrome de Reiter); gota aguda; dismenorrea; dolor de huesos metastásico; dolor de cabeza y migraña; dolor pos-operatorio; dolor leve a moderado debido a inflamación y lesión tisular; pirexia; y cólico renal. Las AINEs incluyen salicilatos, ácidos arilalcanoicos, ácidos 5 2-arilpropiónicos (profenos), ácidos N-arilantranílicos (ácidos fenámicos), oxicams, coxibs (inhibidores de COX-2 selectivos), sulfonanilidas, diclofenac, diflunisal, etodolac, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolac, ácido mefenámico, meloxicam, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, piroxicam, salsalato, sulindac o tolmetina.

10

II. General

La presente invención provee anticuerpos anti-TSLP modificados por técnicas de ingeniería genética y sus usos para tratar trastornos inflamatorios, y particularmente trastornos inflamatorios alérgicos. En una realización preferida, el 15 trastorno inflamatorio es asma. En una realización preferida; el trastorno inflamatorio alérgico es rinosinusitis alérgica, asma alérgica, conjuntivitis alérgica, o dermatitis atópica. La presente invención también proporciona anticuerpos anti-TSLP modificados por técnicas de ingeniería genética para tratar la fibrosis, enfermedad intestinal inflamatoria o linfoma de Hodgkin.

20

Como se emplea en esta invención, el término "TSLP" incluye variantes, isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos de TSLP. La secuencia de aminoácidos de TSLP humana es expuesta en SEC ID NO:4 de la Publicación Internacional No. WO00/17362.

25

III. Anticuerpos Específicos de TSLP Modificados por Técnicas de Ingeniería Genética de la Invención



La invención se refiere a anticuerpos anti-TSLP modificados por técnicas de ingeniería genética que comprenden regiones CDR especificadas.

Los métodos para modificar por técnicas de ingeniería genética recombinantemente anticuerpos han sido descritos, por ej., por Boss et al. (Pat. estadounidense No. 4.816.397), Cabilly et al. (Pat. estadounidense No. 4.816.567), Law et al. (Publicación de Solicitud de Patente Europea No. 438 310) y Winter (Publicación de Solicitud de Patente Europea No. 239400).

Los anticuerpos modificados por técnicas de ingeniería genética de la invención incluyen aquellos en los cuales las modificaciones han sido realizadas a residuos estructurales dentro de VH y/o VL, por ej., para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, dichas modificaciones estructurales son realizadas para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un método consiste en "retromutar" uno o más residuos de estructura a la correspondiente secuencia de línea germinal. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido una mutación somática puede contener residuos de estructura que difieren de la secuencia de línea germinal de la cual deriva el anticuerpo. Dichos residuos pueden ser identificados comparando las secuencias de estructura del anticuerpo con las secuencias de línea germinal de la cual deriva el anticuerpo.

Otro tipo de modificación estructural involucra mutar uno o más residuos dentro de la región de estructura, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar epítopes de células T para de ese modo reducir la potencial inmunogenicidad del anticuerpo. Este método es también denominado "desinmunización" y es descrito en forma más detallada en la Publicación de Patente Estadounidense No. 20030153043.

Adicional o alternativamente a las modificaciones realizadas dentro de la estructura o regiones CDR, los anticuerpos de la invención pueden ser modificados por técnicas de ingeniería genética para incluir modificaciones dentro

de la región de Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tal como la vida media sérica, fijación de complemento, unión al receptor de Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Por añadidura, un anticuerpo de la invención puede ser químicamente modificado (por ej., uno o
5 más restos químicos pueden estar unidos al anticuerpo) o ser modificado para alterar su glicosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones es descrita en forma más detallada más adelante. La numeración de residuos en la región de Fc es aquella del índice EU de Kabat.

10 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo de isotipo IgG4 que comprende una mutación Serina a Prolina en una posición correspondiente a la posición 228 (S228P; índice EU) en la región bisagra de la región constante de cadena pesada. Se ha informado que esta mutación anula la heterogeneidad de puentes disulfuro entre cadenas pesadas en la región bisagra (Angal et al. supra;
15 posición 241 está basado en el sistema de numeración de Kabat.

En una realización, la región bisagra de CH1 es modificada de modo que la cantidad de residuos cisteína en la región bisagra es alterada, por ej., aumentada o disminuida. Este método es descrito adicionalmente en la Patente estadounidense No. 5.677.425. La cantidad de residuos cisteína en la región
20 bisagra de CH1 es alterada para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región bisagra de Fc de un anticuerpo es mutada para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o
25 más mutaciones de aminoácidos son introducidas en la región de interfase del dominio CH2-CH3 del fragmento Fc-bisagra de modo que el anticuerpo tiene una deficiencia en la unión a la proteína estafilocócica A (SpA) con relación a la unión

a Spa del dominio Fc- bisagra natural. Este método es descrito en forma más detallada en la Patente Estadounidense No. 6.165.745.

En otra realización, el anticuerpo es modificado para aumentar su vida media biológica. Son posibles diversos enfoques. Por ejemplo, pueden
5 introducirse una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, según lo descrito en la Patente Estadounidense No. 6.277.375. Alternativamente, para aumentar la vida media biológica, el anticuerpo puede ser alterado dentro de la región CH1 o CL para contener un epítipo de unión al receptor de salvamento tomado de dos lazos de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, según lo
10 descrito en las Patentes Estadounidenses Nos. 5.869.046 y 6.121.022.

En aun otras realizaciones, la región Fc es alterada reemplazando por lo menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar la o las funciones efectora(s) del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados entre residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237,
15 297, 318, 320 y 322 pueden ser reemplazados con un residuo de aminoácido diferente de modo que el anticuerpo tenga una afinidad alterada para un ligando efector pero retenga la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo principal. El ligando efector al cual se le altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 de complemento. Este enfoque es descrito en forma
20 más detallada en las Patentes Estadounidenses Nos. 5.624.821 y 5.648.260.

En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados entre los residuos de aminoácidos 329, 331 y 322 pueden ser reemplazados con un residuo de aminoácidos diferente de modo que el anticuerpo tiene unión a C1q alterada y/o
citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) reducida o suprimida. Este
25 enfoque es descrito en forma más detallada en la Patente Estadounidense No. 6.194.551.

En otro ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las posiciones de aminoácidos 231 y 239 son alterados para de ese modo alterar la capacidad del anticuerpo de fijarse al complemento. Este enfoque es descrito adicionalmente en la Publicación PCT WO 94/29351.

5 En aun otro ejemplo, la región de Fc es modificada para aumentar la capacidad del anticuerpo de influir sobre la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC, según sus siglas en inglés) y/o aumentar la afinidad del anticuerpo para un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267,
 10 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Este enfoque es descrito en forma más detallada en la Publicación de PCT WO 00/42072. Adicionalmente, los sitios de
 15 unión en IgG1 humana para FcγR1, FcγRII, FcγRIII y FcRn han sido mapeados y las variantes con unión mejorada han sido descritas (ver Shields et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604). Las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 han demostrado mejorar la unión a FcγRIII. Por añadidura, se ha demostrado que los siguientes mutantes combinados mejoran la
 20 unión a FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

En aun otra realización, la glicosilación de un anticuerpo es modificada o alterada, para suprimir o agregar restos de carbohidratos a los anticuerpos. Por ejemplo, puede prepararse un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo
 25 carece de glicosilación). La glicosilación puede ser alterada para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Dichas modificaciones de carbohidratos pueden ser logradas, por ejemplo, alterando uno o más sitios de

glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden realizarse una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de estructura de región variable para de ese modo eliminar la glicosilación en ese sitio. Dicha aglicosilación
5 puede aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Ver, por ej., las Patentes Estadounidenses Nos. 5.714.350 y 6.350.861.

Adicional o alternativamente, puede prepararse un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos fucosilo o un anticuerpo que tiene aumento de
10 estructuras GlcNac de bisección. Ese tipo de modelos de glicosilación alterada han demostrado aumentar la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Ese tipo de modificaciones de carbohidratos puede lograrse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada han sido descritas en la técnica y
15 se pueden emplear como células huéspedes en las cuales se expresan los anticuerpos recombinantes de la invención para producir de ese modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (α (1,6)-fucosiltransferasa), de modo que los anticuerpos expresados en las líneas
20 celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen de fucosa en sus carbohidratos. Las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 FUT8^{-/-} fueron creadas mediante la disrupción direccionada del gen FUT8 en células CHO/DG44 utilizando dos vectores de reemplazo (ver la Publicación de Patente Estadounidense No. 20040110704 y Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22).
25 Como otro ejemplo, EP 1.176.195 describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente disrumpido, la cual codifica una fucosil-transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en dicha línea celular exhiben hipofucosilación

reduciendo o eliminando la enzima relacionada con el enlace α -1,6. EP 1.176.195 también describe líneas celulares las cuales tienen una baja actividad enzimática para agregar fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tiene la actividad enzimática, por ejemplo la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La Publicación de PCT WO 03/035835 describe una línea celular CHO variante, células Lec13, con capacidad reducida de unir fucosa a carbohidratos ligados a Asn(297), también dando como resultado la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped (ver también Shields et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Los anticuerpos con un perfil de glicosilación modificado también pueden ser producidos en huevos de gallina, según lo descrito en la Publicación de PCT WO 06/089231. Alternativamente, los anticuerpos con un perfil de glicosilación modificado pueden ser producidos en células vegetales, tales como *Lemna*. La Publicación de PCT WO 99/54342 describe líneas celulares modificadas por técnicas de ingeniería genética para expresar glicosil-transferasas modificadoras de glicoproteínas (por ej., β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas por técnicas de ingeniería genética exhiben un aumento de las estructuras de GlcNac de bisección lo cual da como resultado una mayor actividad de ADCC de los anticuerpos (ver también Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Alternativamente, los residuos de fucosa del anticuerpo pueden ser disociados utilizando una enzima fucosidasa; por ej., la fucosidasa α -L-fucosidasa elimina residuos de fucosilo de los anticuerpos (Tarentino et al. (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Otra modificación de los anticuerpos en esta invención que es contemplada por esta descripción es la pegilación. Un anticuerpo puede ser pegilado, por ejemplo, para aumentar la vida media biológica (por ej., suero) del



anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o su fragmento, típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un derivado de éster o aldehído reactivo de PEG, bajo condiciones en las cuales uno o más grupos de PEG se unen al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo. Preferentemente, la
5 pegilación se lleva a cabo por medio de una reacción de acilación o de una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero hidrosoluble reactivo análogo). Como se emplea en esta invención, el término "polietilenglicol" tiene el propósito de abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivar otras proteínas, tal como monoalcoxi(C1-C10) -
10 o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo a ser pegilado es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para pegar proteínas son conocidos en la técnica y pueden ser aplicados a los anticuerpos de la invención. Véase, por ej., EP 0 154 316 y EP 0 401 384.

Las variantes de secuencias de aminoácidos de anticuerpo anti-TSLP
15 humanizado de la invención pueden ser preparadas introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo anti-TSLP humanizado, o mediante síntesis peptídica. Ese tipo de variantes incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos mostradas para los anticuerpos anti-TSLP
20 humanizados descritos y reivindicados en esta invención. Puede realizarse cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar al constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas. Según lo descrito anteriormente, los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos pos-translacionales del anticuerpo anti-TSLP
25 humanizado, tal como cambiando la cantidad o posición de sitios de glicosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del polipéptido del anticuerpo anti-TSLP humanizado que son ubicaciones preferidas

para mutagénesis se denomina “mutagénesis por barrido de alanina”, según lo descrito por Cunningham y Wells (1989) *Science* 244: 1081-1085. Aquí, un residuo o grupo de residuos objetivo son identificados (por ej., residuos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys, y Glu) y reemplazados por un aminoácido neutro o cargado negativamente (más preferentemente alanina o polialanina) para efectuar la interacción de los aminoácidos con el antígeno de TSLP. Los residuos de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones, luego son refinados introduciendo otras variantes o variantes adicionales en, o para, los sitios de sustitución. Por consiguiente, si bien el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos es predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no necesariamente debe ser predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio determinado, se lleva a cabo una mutagénesis por barrido de Ala o al azar en el codón o región objetivo y las variantes del anticuerpo anti-TSLP humanizado son seleccionadas para determinar la actividad deseada.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de terminal amino- y/o carboxilo que oscilan en longitud entre un residuo y polipéptidos que contienen cien residuos o más, así como también inserciones intrasecuencias de residuos de aminoácido único o de múltiples aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen anticuerpo anti-TSLP humanizado con un residuo de metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado a una etiqueta epítoto. Otras variantes insercionales de la molécula del anticuerpo anti-TSLP humanizado incluyen la fusión al término N o C de anticuerpo anti-TSLP humanizado de una enzima o un polipéptido lo cual aumenta la vida media sérica del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. estas variantes tienen por lo menos un residuo de aminoácido en la molécula del

anticuerpo anti-TSLP humanizado eliminado y un residuo diferente insertado en su lugar. Los sitios de mayor interés para mutagénesis sustitucional incluyen los lazos hipervariables, pero las alteraciones FR son también contempladas. Los residuos de regiones hipervariables o residuos FR involucrados en la unión al antígeno son generalmente sustituidos en forma relativamente conservadora.

Aun otro tipo de variante de aminoácidos es la sustitución de residuos para proporcionar una mayor estabilidad química del anticuerpo humanizado final.

En ciertas realizaciones, será deseable cambiar ciertos aminoácidos que contienen cadenas laterales expuestas por otro residuo de aminoácido a fin de proporcionar una mayor estabilidad química del anticuerpo final, de la siguiente manera. Por ejemplo, un residuo de asparagina (Asn) puede ser cambiado por Gln o Ala para reducir el potencial de formación de isoaspartato en cualquier secuencia Asn-Gly dentro de una CDR. Un problema similar puede ocurrir en una secuencia Asp-Gly. Reissner y Aswad (2003) *Cell. Mol. Life Sci.* 60:1281. La formación de isoaspartato puede debilitar o anular por completo la unión de un anticuerpo a su antígeno objetivo. Ver, Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731 en 734. En una realización, la asparagina es cambiada a glutamina (Gln). También puede ser conveniente alterar un aminoácido adyacente a un residuo de asparagina (Asn) o glutamina (Gln) para reducir la probabilidad de desamidación, lo cual ocurre a mayores velocidades cuando aminoácidos pequeños ocurren adyacentes a asparagina o glutamina. Ver, Bischoff & Kolbe (1994) *J. Chromatog.* 662:261. Adicionalmente, cualquier residuo de metionina (típicamente Met expuesta a solvente) en CDRs puede ser cambiado a Lys, Leu, Ala, o Phe a fin de reducir la posibilidad de que se oxide el azufre de metionina, lo cual podría reducir la afinidad de unión al antígeno y también podría contribuir con la heterogeneidad molecular en la preparación final del anticuerpo. *Id.* En una realización, la metionina es cambiada a alanina (Ala). Adicionalmente, a fin de

prevenir o reducir al mínimo el potencial de enlaces peptídicos Asn-Pro escindibles, puede ser conveniente alterar cualquier combinación de Asn-Pro encontrada en una CDR a Gln-Pro, Ala-Pro, o Asn-Ala. Los anticuerpos con dichas sustituciones son subsiguientemente seleccionados para asegurar que las sustituciones no disminuyan la afinidad de unión a TSLP u otra actividad biológica deseada a niveles inaceptables.

TABLA 2
Variantes de CDR estabilizadoras ejemplares

Residuo de CDR	Secuencia Variante Estabilizadora
Asn-Gly (N-G)	Gln-Gly, Ala-Gly, o Asn-Ala (Q-G), (A-G), o (N-A)
Asp-Gly (D-G)	Glu-Gly, Ala-Gly o Asp-Ala (E-G), (A-G), o (D-A)
Met (típicamente expuesta a solvente) (M)	Lys, Leu, Ala, o Phe (K), (L), (A), o (F)
Asn (N)	Gln o Ala (Q) o (A)
Asn-Pro (N-P)	Gln-Pro, Ala-Pro, o Asn-Ala (Q-P), (A-P), o (N-A)

Adicionalmente, los residuos de metionina en CDRs de roedor pueden ser cambiados para reducir la posibilidad de que el azufre de metionina se oxide, lo cual podría reducir la afinidad de unión al antígeno y también podría contribuir a la heterogeneidad molecular en la preparación final de anticuerpo. *Id.* En una realización, la metionina es cambiada a alanina (A). Los anticuerpos con dichas sustituciones son posteriormente seleccionados para asegurar que las sustituciones no disminuyan la afinidad de unión a TSLP hasta niveles inaceptables.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos de anticuerpo específico de TSLP humanizado se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, aunque sin limitarse a, aislamiento de una fuente natural (en el caso de
5 variantes de secuencias de aminoácidos naturales) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR, y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante de anticuerpo anti-TSLP humanizado.

Comúnmente, las variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo
10 anti-TSLP humanizado tendrán una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 97% de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos del anticuerpo humanizado original de la cadena pesada o la cadena ligera más preferentemente por lo menos 98%, más preferentemente por lo menos 99%. La identidad u homología con respecto a esta secuencia es definida
15 en esta invención como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidato que son idénticos con los residuos de anti-TSLP humanizado, luego de alinear las secuencias e introducir espacios vacíos, en caso necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencias, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencias. Ninguna de
20 las extensiones, supresiones o inserciones de terminal N, terminal C o internas en la secuencia del anticuerpo debe ser interpretada como afectando la identidad o la homología de secuencias.

El anticuerpo humanizado puede ser seleccionado entre cualquiera de las clases de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA, e IgE.
25 Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo de IgG. Puede emplearse cualquier isotipo de IgG, incluyendo IgG₁, IgG₂, IgG₃, e IgG₄. Las variantes de los isotipos de IgG son también contempladas. El anticuerpo humanizado puede

comprender secuencias de más de una clase o isotipo. La optimización de las secuencias de dominio constante necesarias para generar la actividad biológica deseada se logra fácilmente seleccionando los anticuerpos en los ensayos biológicos descritos más adelante.

5 Asimismo, puede emplearse cualquiera de las clases de cadena ligera en las composiciones y métodos de la presente invención. Específicamente, kappa, lambda, o sus variantes son útiles en las presentes composiciones y métodos.

 Puede emplearse cualquier porción adecuada de las secuencias de CDR del anticuerpo no humano. Las secuencias de CDR pueden ser mutagenizadas
10 por sustitución, inserción o delección de por lo menos un residuo de modo tal que la secuencia de CDR sea distinta de la secuencia del anticuerpo humano y no humano empleada. Se contempla que dichas mutaciones serían mínimas. Típicamente, por lo menos 95% de los residuos de anticuerpo humanizado corresponderán a aquellos de los residuos de CDR no humanos, y con máxima
15 preferencia más del 97%.

 Puede utilizarse cualquier porción adecuada de las secuencias FR del anticuerpo humano. Las secuencias FR pueden ser mutagenizadas por
sustitución, inserción o delección de por lo menos un residuo de modo que la
secuencia FR sea distinta de la secuencia del anticuerpo humano y no humano
20 empleada. Se contempla que dichas mutaciones serían mínimas. Típicamente, por lo menos 75% de los residuos de anticuerpo humanizado corresponderán a aquellos de los residuos de FR humanos, más a menudo 90%, y con máxima
preferencia más del 95%.

 Los residuos de CDR y FR son determinados de acuerdo con la definición
25 de secuencias convencional de Kabat. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda Md. (1987).



En una realización preferida, una composición de unión de acuerdo con la invención comprende, una o más de las siguientes secuencias:

- La secuencia de CDR-H1 GYIFTDYAMH (SEC ID NO: 1).
- 5 • La secuencia de CDR-H2 TFIPLLDTSDYAQKFQG (SEC ID NO: 2).
- La secuencia de CDR-H3 MGVTHSYVMDA (SEC ID NO: 3).
- La secuencia de CDR-L1 RASQPISISVH (SEC ID NO: 4).
- La secuencia de CDR-L2 FASQSIG (SEC ID NO: 5).
- La secuencia de CDR-L3 QQTFSLPYT (SEC ID NO: 6).
- 10 • La secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable mostrada en SEC ID NO:7.
- La secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable mostrada en SEC ID NO: 8.
- La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena pesada variable mostrada en SEC ID NO:9.
- 15 • La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena ligera variable mostrada en SEC ID NO:10.
- La secuencia de aminoácidos de cadena pesada mostrada en SEC ID NO:11. Esta secuencia puede comprender además la siguiente secuencia líder: MAVLGLLFCLVTFPSCVLS (SEC ID NO:15).
- 20 • La secuencia de aminoácidos de cadena ligera mostrada en SEC ID NO: 12. Esta secuencia puede comprender además la siguiente secuencia líder: MAPVQLLGLLVFLPAMRC (SEC ID NO:16).
- La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena pesada se muestra en SEC ID NO:13. Esta secuencia puede comprender además una secuencia que codifica una secuencia líder, preferentemente la siguiente secuencia líder: MAVLGLLFCLVTFPSCVLS (SEC ID NO:15).
- 25 • La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena ligera se muestra en SEC ID NO:14. Esta secuencia puede comprender además una secuencia que codifica una secuencia líder,
- 30

preferentemente la siguiente secuencia líder:
MAPVQLLGLLVLFLPAMRC (SEC ID NO:16).

En algunas realizaciones, se pueden añadir diferentes dominios constantes
5 a las regiones de V_L y V_H humanizadas proporcionadas en esta invención. Por
ejemplo, si un uso pretendido en particular de un anticuerpo (o fragmento) de la
presente invención requiriera funciones efectoras alteradas, puede emplearse un
dominio constante de cadena pesada que no sea IgG1. Si bien los anticuerpos de
IgG1 proporcionan una vida media larga y funciones efectoras, tales como
10 activación del complemento y citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo,
dichas actividades pueden no ser convenientes para todos los usos del
anticuerpo. En esos casos, puede emplearse, por ejemplo, un dominio constante
de IgG4.

IV. Conjugados de anticuerpos

15 Los compuestos de unión de la invención, por ejemplo el anticuerpo o
fragmentos del anticuerpo de la invención, también pueden ser conjugados a un
resto químico. El resto químico puede ser, *inter alia*, un polímero, un radionúclido
o un factor citotóxico. Preferentemente, el resto químico es un polímero el cual
aumenta la vida media de la molécula del anticuerpo en el cuerpo de un sujeto.
20 Los polímeros adecuados incluyen, aunque sin limitarse a, polietilenglicol (PEG)
(por ej., PEG con un peso molecular de 2kDa, 5 kDa, 10 kDa, 12kDa, 20 kDa,
30kDa o 40kDa), dextrano y monometoxipolietilenglicol (mPEG). Lee, *et al.*,
(1999) (*Bioconj. Chem.* 10:973-981) describe anticuerpos de una sola cadena
conjugados a PEG. Wen, *et al.*, (2001) (*Bioconj. Chem.* 12:545-553) describen la
25 conjugación de anticuerpos con PEG el cual es unido a un quelante
radiometálico (ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA)).

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención también
pueden ser conjugados con etiquetas tales como ^{99}Tc , ^{90}Y , ^{111}In , ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H ,

^{131}I , ^{11}C , ^{15}O , ^{13}N , ^{18}F , ^{35}S , ^{51}Cr , ^{57}To , ^{226}Ra , ^{60}Co , ^{59}Fe , ^{57}Se , ^{152}Eu , ^{67}Cu , ^{217}Ci , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd , ^{234}Th , y ^{40}K , ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{52}Tr y ^{56}Fe .

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención también pueden ser conjugados con etiquetas fluorescentes o quimiluminiscentes, incluyendo fluoróforos tales como quelatos de tierras raras, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, isotiocianato, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftalaldehído, fluorescamina, ^{152}Eu , dansilo, umbeliferona, luciferina, etiqueta luminar, etiqueta isoluminar, una etiqueta de éster de acridinio aromático, una etiqueta de imidazol, una etiqueta de sal de acridimio, una etiqueta de éster de oxalato, una etiqueta de aequorina, 2,3-dihidroftalazinadionas, biotina/avidina, etiquetas espín y radicales libres estables.

Las moléculas de anticuerpo también pueden ser conjugadas a un factor citotóxico tal como toxina de la difteria, cadena de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modicina, alfa-sarcina, proteínas y compuestos de *Aleurites fordii* (por ej. ácidos grasos), proteínas de diantina, proteínas de *Phytoiaccia americana* PAPI, PAPII, y PAP-S, inhibidor de *momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *saponaria officinalis*, mitogelina, restrictocina, fenomicina, y enomicina.

Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para conjugar las moléculas de anticuerpos de la invención a los diversos restos, incluyendo aquellos métodos descritos por Hunter, *et al.*, (1962) *Nature* 144:945; David, *et al.*, (1974) *Biochemistry* 13:1014; Pain, *et al.*, (1981) *J. Immunol. Meth.* 40:219; y Nygren, J., (1982) *Histochem. and Cytochem.* 30:407. Los métodos para conjugar anticuerpos son convencionales y muy bien conocidos en la técnica.

En aun otras realizaciones, pueden añadirse diferentes dominios constantes a las regiones V_L y V_H humanizadas derivadas de las CDRs proporcionadas en esta invención. Por ejemplo, si un uso pretendido en particular

de un anticuerpo (o fragmento) de la presente invención requiriese de funciones efectoras alteradas, puede emplearse un dominio constante de cadena pesada que no sea IgG1, o IgG1/IgG4 híbrido.

Si bien los anticuerpos de IgG1 proporcionan una vida media larga y funciones efectoras, tales como la activación del complemento y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo, dichas actividades pueden no ser deseables para todos los usos del anticuerpo. En esos casos, puede emplearse un dominio constante de IgG4, por ejemplo. En Mab8D5 hu, el dominio constante de IgG4 difiere del dominio constante de IgG4 humana natural (Nº de Acceso Swiss-Prot P01861.1, cuya descripción se incorpora a la presente como referencia) en la posición 108, donde el Ser108 natural es reemplazado por Pro, a fin de evitar un potencial enlace de disulfuro entre cadenas entre Cys106 y Cys109 que podría interferir con la adecuada formación de enlaces disulfuro entre cadenas. Ver Angal *et al.* (1993) *Mol. Immunol.* 30:105.

V. Actividad biológica de los compuestos de unión de la invención

Los compuestos de unión que tienen las características identificadas en esta invención son siendo deseables e un anticuerpo anti-TSLP humanizado pueden ser seleccionados para actividad biológica inhibidora *in vitro* o para afinidad de unión adecuada.

Las afinidades de anticuerpos (por ej., para TSLP humana) pueden determinarse utilizando análisis estándar. Los anticuerpos humanizados preferidos son aquellos que se unen a TSLP humana con un valor K_D de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M; preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} M; más preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{-9} M; y con máxima preferencia no más de aproximadamente 1×10^{-10} M.

Los anticuerpos y sus fragmentos útiles en las presentes composiciones y métodos son anticuerpos y fragmentos biológicamente activos. Como se emplea



en esta invención, el término "biólogicamente activo" se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse al epítipo antigénico deseado y ejercer directa o indirectamente un efecto biológico. Típicamente, estos efectos son el resultado de la falla de TSLP para unirse a su receptor. En una
5 realización, el anticuerpo y los fragmentos del mismo útiles en las presentes composiciones y métodos inhiben: la proliferación inducida por hTSLP de una línea celular Baf-3 transfectada con el receptor de hTSLP e IL-7Ralfa; la expresión de luciferasa inducida por hTSLP de una línea celular Baf-3 transfectada con el receptor de TSLP y un sistema reporter (informante) de
10 luciferasa; la secreción de TARC inducida por hTSLP de monocitos primarios humanos aislados de PBMCs; y la inducción de la diferenciación de Th2.

Como se emplea en esta invención, el término "específico" se refiere a la unión selectiva del anticuerpo con el epítipo antigénico objetivo. Los anticuerpos pueden ser analizados para determinar su especificidad de unión comparando la
15 unión a TSLP a la unión a antígeno o mezcla antigénica irrelevante bajo un conjunto determinado de condiciones. Si el anticuerpo se une a TSLP al menos 10, y preferentemente 20 o 50 veces más que el antígeno o la mezcla antigénica irrelevante luego se considera que es específico. Un anticuerpo que "se une específicamente" a TSLP no se une a proteínas que no comprenden las
20 secuencias derivadas de TSLP, es decir, "especificidad" como se emplea en esta invención se refiere a la especificidad de TSLP, y no a cualquier otra secuencia que pudiere estar presente en la proteína en cuestión. Por ejemplo, como se emplea en esta invención, un anticuerpo que "se une específicamente" a TSLP típicamente se unirá a FLAG-h TSLP, que es una proteína de fusión que
25 comprende TSLP y una etiqueta peptídica FLAG[®], pero no se une a la etiqueta peptídica FLAG[®] sola o cuando se fusiona a una proteína que no es TSLP.

VI. Composiciones Farmacéuticas

Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles, el anticuerpo o su fragmento se mezcla con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, ver, por ej., *Remington's Pharmaceutical Sciences* and *U.S. Pharmacopeia: National Formulary*, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). Las formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico pueden ser preparadas mezclando con portadores, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables en la forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, suspensiones, soluciones o suspensiones acuosas (ver, por ej., Hardman, *et al.* (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, NY; Avis, *et al.* (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY).

La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones de anticuerpos, administradas por sí solas o en combinación con un agente inmunosupresivo, pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ej., para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en 50% de la población). La relación de la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación entre LD₅₀ y ED₅₀. Los anticuerpos que exhiben altos índices terapéuticos son preferidos. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de cultivos celulares y estudios en animales pueden ser empleados en la formulación de un rango de



dosificación para utilizar en seres humanos. La dosificación de dichos compuesto se encuentra, con preferencia, dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con poca o sin toxicidad alguna. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la

5 ruta de administración utilizada.

Las rutas de administración adecuadas incluyen la administración parenteral, tal como la administración intramuscular, intravenosa o subcutánea. La administración de anticuerpo utilizado en la composición farmacéutica o para practicar el método de la presente invención puede llevarse a cabo de diversas

10 maneras convencionales, tales como ingestión oral, inhalación, aplicación tópica o inyección cutánea, subcutánea, intraperitoneal, parenteral, intraarterial o intravenosa. En una realización, el compuesto de unión de la invención es administrado intravenosamente. En otra realización, el compuesto de unión de la invención es administrado subcutáneamente.

15 Alternativamente, se puede administrar el anticuerpo en forma local más que sistémica, por ejemplo, por inyección del anticuerpo directamente en una articulación artrítica o lesión inducida por patógenos caracterizada por inmunopatología, a menudo en una formulación de liberación sostenida o de depósito. Por añadidura, se puede administrar el anticuerpo en un sistema de

20 administración de fármaco direccionado, por ejemplo, en un liposoma recubierto con un anticuerpo específico de tejido, que se direcciona hacia, por ejemplo, la articulación artrítica o lesión inducida por patógeno caracterizado por inmunopatología. Los liposomas serán direccionados hacia y serán absorbidos selectivamente por el tejido afectado.

25 La selección de un régimen de administración para un agente terapéutico depende de diversos factores, que incluyen el índice de recambio (turnover) sérico o tisular de la entidad, el nivel de los síntomas, la inmunogenicidad de la

entidad, y la accesibilidad de las células objetivo en la matriz biológica. Preferentemente, un régimen de administración aumenta al máximo la cantidad de agente terapéutico administrado al paciente en forma consistente con un nivel aceptable de efectos colaterales. Por consiguiente, la cantidad de agente biológico administrado depende en parte de la entidad en particular y de la severidad de la afección que se está tratando. Se pueden encontrar pautas para la selección de dosis apropiadas de anticuerpos, citoquinas y moléculas pequeñas (ver, por ej., Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert, *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom, *et al.* (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon, *et al.* (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz, *et al.* (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh, *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky, *et al.* (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602).

La determinación de la dosis apropiada es realizada por el médico clínico, por ej., empleando parámetros o factores conocidos o sospechados en la técnica que afectan al tratamiento o que se supone que afectan al tratamiento. En general, la dosis comienza con una cantidad en cierta medida inferior a la dosis óptima y es aumentada en pequeños incrementos de ahí en adelante hasta que se logra el efecto deseado u óptimo con relación a cualquier efecto colateral negativo. Las medidas importantes de diagnóstico incluyen aquellas de síntomas de, por ej., la inflamación o nivel de citoquinas inflamatorias producidas. Preferentemente, un agente biológico que será empleado es derivado de la misma especie que el animal que se quiere someter a tratamiento, reduciendo al

mínimo de ese modo una respuesta inflamatoria, autoinmune o proliferativa al reactivo.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y citoquinas pueden ser proporcionados por infusión continua o por dosis en intervalos de, por ej., un día, una semana, o 1-7 veces por semana. Las dosis pueden ser proporcionadas por vía intravenosa, subcutánea, tópica, oral, nasal, rectal, intramuscular, intracerebral, intraespinal, o por inhalación. Un protocolo de dosificación preferido es aquel que involucra la dosis máxima o frecuencia de dosis que evita efectos colaterales indeseables significativos. Una dosis semanal total es generalmente por lo menos 0,05 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, más en general por lo menos 0,2 $\mu\text{g/kg}$, más generalmente por lo menos 0,5 $\mu\text{g/kg}$, típicamente por lo menos 1 $\mu\text{g/kg}$, más típicamente por lo menos 10 $\mu\text{g/kg}$, más típicamente aun por lo menos 100 $\mu\text{g/kg}$, con preferencia por lo menos 0,2 mg/kg, más preferentemente por lo menos 1,0 mg/kg, con máxima preferencia por lo menos 2,0 mg/kg, óptimamente por lo menos 10 mg/kg, más óptimamente por lo menos 25 mg/kg, y más óptimamente aun por lo menos 50 mg/kg (ver, por ej., Yang, *et al.* (2003) *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Herold, *et al.* (2002) *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liu, *et al.* (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portielji, *et al.* (20003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:133-144). La dosis deseada de un agente terapéutico de molécula pequeña, por ej., un mimético peptídico, producto natural o químico orgánico, es aproximadamente igual a la de un anticuerpo o polipéptido sobre la base de moles/kg.

Como se emplea en esta invención, "inhibir" o "tratar" o "tratamiento" incluye una postergación del desarrollo de los síntomas asociados con la enfermedad autoinmune o inmunopatología inducida por patógenos y/o una reducción en la severidad de dichos síntomas que se desarrollarán o se espera que se desarrollen. Los términos incluyen además mejorar los síntomas de

inmunopatología existentes no controlados o no deseados, inducidos por patógenos o relacionados con el sistema autoinmune, evitar síntomas adicionales, y mejorar o prevenir las causas subyacentes de dichos síntomas. Por lo tanto, los términos denotan que un resultado beneficioso ha sido otorgado a un
5 sujeto vertebrado con una enfermedad inflamatoria.

Como se emplea en esta invención, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad de un anticuerpo anti-TSLP o su fragmento, que cuando se administra por sí solo o en combinación con un agente terapéutico adicional a una célula, tejido, o sujeto es eficaz para prevenir o
10 mejorar la enfermedad autoinmune o enfermedad o afección asociada con inmunopatología inducida por patógeno o el progreso de la enfermedad. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere además a aquella cantidad del compuesto suficiente para dar como resultado la mejora de los síntomas, por ej., tratamiento, curación, prevención o mejora de la afección médica relevante, o un
15 aumento en el índice de tratamiento, curación, prevención o mejora de dichas afecciones. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual administrado por sí solo, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a ese ingrediente por sí solo. Cuando se aplica a una combinación, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que da como
20 resultado el efecto terapéutico, ya sea administrado en combinación, en forma consecutiva o simultánea. Una cantidad eficaz de agente terapéutico disminuirá los síntomas típicamente en por lo menos 10%; generalmente en por lo menos 20%; preferentemente por lo menos aproximadamente 30%; más preferentemente por lo menos 40%, y con máxima preferencia en por lo menos
25 50%.

Los métodos para la administración conjunta o tratamiento con un anticuerpo anti-TSLP o su fragmento de unión al antígeno de la presente



invención y un segundo agente terapéutico, por ej., una citoquina, esteroide, agente quimioterapéutico, antibiótico o radiación (o cualquier agente de ese tipo descrito en esta invención) forman parte de la presente invención, ver, en general, por ej., *Hardman, et al.* (eds.) (2001) *Goodman and Gilman's The*
5 *Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed., McGraw-Hill, New York, NY; Poole y Peterson (eds.) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner y Longo (eds.) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA. Los anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno y sus
10 composiciones farmacéuticas de la invención también pueden contener otros agentes inmunosupresivos o inmunomoduladores. Puede emplearse cualquier agente inmunosupresivo adecuado, incluyendo, aunque sin limitarse a agentes antiinflamatorios, corticosteroides, ciclosporina, tacrolimus (es decir, FK-506), sirolimus, interferones, receptores de citoquina solubles (por ej., sTNRF y sIL-1R),
15 agentes que neutralizan la actividad de citoquina (por ej., inflixmab, adalimumab, golimumab, etanercept), micofenolato mofetilo, 15-deoxispergualina, talidomida, glatiramer, azatioprina, leflunomida, ciclofosfamida, metotrexato, y similares. También pueden proporcionarse drogas antiinflamatorias no esteroideas con un anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno o su composición farmacéutica de
20 la presente invención. La composición farmacéutica también puede ser empleada con otras modalidades terapéuticas tales como fototerapia y radiación. El alcance de la presente invención incluye composiciones que comprenden cualquier anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente invención y cualquier segundo agente terapéutico (por ej., según lo descrito en
25 esta invención, por ej., donde el anticuerpo o fragmento es formulado en forma separada del segundo agente terapéutico o donde son formulados en forma conjunta).

Los típicos sujetos de veterinaria, experimentales o de investigación incluyen monos, perros, gatos, ratas, ratones, conejos, conejillos de Indias, caballos y seres humanos.

VII. Producción de Anticuerpos

5 Para la producción recombinante de los anticuerpos de la presente invención, los ácidos nucleicos que codifican las dos cadenas son aislados e insertados en uno o más vectores replicables para ulterior clonación (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal es fácilmente aislado y secuenciado empleando procedimientos
10 convencionales (por ej., utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Muchos vectores están disponibles. Los componentes de los vectores generalmente incluyen, aunque sin limitarse a, uno o más de los siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes
15 marcadores, un elemento mejorador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción. En una realización, tanto las cadenas ligeras como pesadas del anticuerpo anti-TSLP humanizado de la presente invención son expresadas del mismo vector, por ej., un plásmido o un vector adenoviral.

Los anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno de la presente
20 invención pueden ser producidos por cualquier método conocido en la técnica. En una realización, los anticuerpos son expresados en células de mamífero o de insecto en cultivo, tales como células de ovario de hámster chino (CHO, siglas correspondientes a "Chinese hamster ovary"), células de riñón embrionario humano (HEK, siglas correspondientes a "human embryonic kidney") 293, células
25 NSO de mieloma de ratón, células de riñón de hámster bebé (BHK, siglas correspondientes a "baby hamster kidney"), células de ovario de *Spodoptera frugiperda* (Sf9). En una realización de la invención, los anticuerpos y sus

fragmentos de unión al antígeno son producidos en células fungales tales como células de *Pichia*, células de *Pichia pastoris*, células de *Pichia finlandica*, células de *Pichia trehalophila*, células de *Pichia koclamae*, células de *Pichia membranaefaciens*, células de *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*),
5 células de *Pichia opuntiae*, células de *Pichia thermotolerans*, células de *Pichia salictaria*, células de *Pichia guercuum*, células de *Pichia pijperi*, células de *Pichia stiptis*, células de *Pichia methanolica*, células de *Saccharomyces cerevisiae*, células de *Saccharomyces*, células de *Hansβnula polymorpha*, células de *Kluyveromyces*, células de *Kluyveromyces lactis*, células de *Candida albicans*,
10 células de *Aspergillus nidulans*, células de *Aspergillus niger*, células de *Aspergillus oryzae*, células de *Trichoderma reesei*, células de *Chrysosporium lucknowense*, células de *Fusarium*, células de *Fusañum gramineum*, células de *Fusarium venenatum* o células de *Neuraspota crassa*.

En una realización, los anticuerpos secretados de células CHO son recuperados y purificados mediante métodos cromatográficos convencionales,
15 tales como proteína A, intercambio catiónico, intercambio aniónico, interacción hidrófoba, y cromatografía de hidroxapatita. Los anticuerpos resultantes son concentrados y almacenados en acetato de sodio 20 mM, pH 5,5.

En otra realización, los anticuerpos de la presente invención son producidos en levadura de acuerdo con los métodos descritos en
20 WO2005/040395. Brevemente, se introducen vectores que codifican las cadenas ligera y pesada individuales de un anticuerpo de interés en diferentes células haploides de levadura, por ej., diferentes tipos de apareamiento de la levadura *Pichia pastoris*, dichas células haploides de levadura son opcionalmente
25 auxótrofos complementarios. Luego, las células de levadura haploides transformadas pueden ser apareadas o fusionadas para brindar una célula de levadura diploide capaz de producir tanto las cadenas pesada como las cadenas

ligeras. Luego, la cepa diploide es capaz de secretar el anticuerpo totalmente ensamblado y biológicamente activo. Los niveles de expresión relativos de las dos cadenas pueden ser optimizados, por ejemplo, empleando vectores con diferente cantidad de copias, utilizando promotores transcripcionales de diferentes intensidades, o induciendo la expresión de promotores inducibles que impulsan la transcripción de los genes que codifican una o ambas cadenas.

En una realización, las respectivas cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-TSLP son introducidas en células haploides de levadura para crear una genoteca de cepas de levadura haploides de un tipo de apareamiento que expresan una pluralidad de cadenas ligeras, y una genoteca de cepas de levadura haploides de un tipo diferente de apareamiento que expresan una pluralidad de cadenas pesadas. Estas genotecas de cepas haploides pueden ser apareadas (o fusionadas como esferoplastos) para producir una serie de células de levadura diploides que expresan una genoteca combinatoria de anticuerpos compuesta por las diversas permutaciones posibles de cadenas ligeras y pesadas. La genoteca combinatoria de anticuerpos puede ser luego sometida a un screening para determinar si alguno de los anticuerpos tiene propiedades que son superiores (por ej., afinidad más alta para TSLP) a aquellas de los anticuerpos originales. Ver, por ej., WO2005/040395.

En otra realización, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos de dominio humano en los cuales las porciones de un dominio variable del anticuerpo están ligadas en un polipéptido de peso molecular aproximadamente 13 kDa. Ver, por ej., la Publicación de Pt. Estadounidense No. 2004/0110941. Dichos agentes de dominio único y bajo peso molecular proporcionan diversas ventajas en términos de facilidad de síntesis, estabilidad y ruta de administración.

VIII. Usos

La presente invención proporciona métodos para utilizar anticuerpos anti-TSLP modificados por técnicas de ingeniería genética para el tratamiento y diagnóstico de trastornos inflamatorios (por ejemplo, en mamíferos tales como los seres humanos).

5 En una realización preferida, el trastorno inflamatorio es asma.

En otra realización preferida, el trastorno inflamatorio es un trastorno inflamatorio alérgico. En una realización preferida, el trastorno inflamatorio alérgico es rinosinusitis alérgica, asma alérgica, conjuntivitis alérgica o dermatitis atópica.

10 La presente invención proporciona métodos para utilizar anticuerpos anti-TSLP modificados por técnicas de ingeniería genética para el tratamiento y diagnóstico de fibrosis, enfermedad intestinal inflamatoria, linfoma de Hodgkin, infecciones virales respiratorias u otras infecciones virales, artritis reumatoide, o cualquier otro trastorno caracterizado por inflamación en el sitio de lesión.

15 El amplio alcance de esta invención es mejor comprendido con referencia a los siguientes ejemplos, los cuales no tienen el propósito de limitar las invenciones a las realizaciones específicas.

Todas las citaciones realizadas en esta invención son incorporadas a la presente a modo de referencia de la misma manera como si cada publicación o
20 solicitud de patente individual estuviese específica e individualmente indicada como incorporada a modo de referencia.

Pueden efectuarse muchas modificaciones y variaciones de esta invención sin apartarse de su espíritu y alcance, como será evidente para los expertos en la técnica. Las realizaciones específicas descritas en esta invención son ofrecidas a
25 modo de ejemplo solamente, y la invención debe ser limitada por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance total de equivalentes a los cuales dichas reivindicaciones tienen derecho; y la invención no debe ser limitada

por las realizaciones específicas que han sido presentadas en esta invención a modo de ejemplo.

Ejemplo 1

Métodos Generales

- 5 Se describen los métodos convencionales en biología molecular (Maniatis *et al.* (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA).
- 10 Métodos convencionales también aparecen en Ausbel *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Tomos 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, que describe la clonación en células bacterianas y mutagénesis de ADN (Tomo 1), clonación en células de mamífero y levadura (Tomo 2), glicoconjugados y expresión proteica (Tomo 3), y bioinformática (Tomo 4).
- 15 Los métodos para la purificación proteica incluyendo inmunoprecipitación, cromatografía, electroforesis, centrifugación y cristalización son descritos (Coligan *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York). El análisis químico, modificación química, modificación pos-
- 20 descriptos (ver, por ej., Coligan *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*,
- 25 Piscataway, N.J., pp. 384-391). La producción, purificación y fragmentación de anticuerpos policlonales y monoclonales son descritos (Coligan *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York;

Harlow y Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow y Lane, *supra*). Las técnicas estándares para caracterizar la interacción de ligando/ receptor se encuentran disponibles (ver, por ej., Coligan *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., Nueva York).

Los anticuerpos de cadena única y diacuerpos son descritos (ver, por ej., Malecki *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:213-218; Conrath *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:7346-7350; Desmyter *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:26285-26290; Hudson y Kortt (1999) *J. Immunol. Methods* 231:177-189; y Pat. Estadounidense No. 4.946.778). Los anticuerpos bifuncionales son proporcionados (ver, por ej., Mack, *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7021-7025; Carter (2001) *J. Immunol. Methods* 248:7-15; Volkel, *et al.* (2001) *Protein Engineering* 14:815-823; Segal, *et al.* (2001) *J. Immunol. Methods* 248:1-6; Brennan, *et al.* (1985) *Science* 229:81-83; Raso, *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272:27623; Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; Traunecker, *et al.* (1991) *EMBO J.* 10:3655-3659; y Pat. Estadounidenses Nos. 5.932.448, 5.532.210, y 6.129.914).

Los anticuerpos biespecíficos son también proporcionados (ver, por ej., Azzoni *et al.* (1998) *J. Immunol.* 161:3493; Kita *et al.* (1999) *J. Immunol.* 162:6901; Merchant *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 274:9115; Pandey *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275:38633; Zheng *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:12999; Propst *et al.* (2000) *J. Immunol.* 165:2214; Long (1999) *Ann. Rev. Immunol.* 17:875).

Los anticuerpos pueden ser conjugados, por ej., a moléculas pequeñas de drogas, enzimas, liposomas, polietilenglicol (PEG). Los anticuerpos son útiles para propósitos terapéuticos, de diagnóstico, kit u otros fines, e incluyen anticuerpos acoplados, por ej., a colorantes, radioisótopos, enzimas o metales, por ej., oro coloidal (ver, por ej., Le Doussal *et al.* (1991) *J. Immunol.* 146:169-

175; Gibellini *et al.* (1998) *J. Immunol.* 160:3891-3898; Hsing y Bishop (1999) *J. Immunol.* 162:2804-2811; Everts *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168:883-889).

Los métodos para la citometría de flujo, incluyendo la citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS, según siglas en inglés), están disponibles (ver, 5 por ej., Owens *et al.* (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley y Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2nd ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ). Los reactivos fluorescentes adecuados para modificar ácidos nucleicos, incluyendo cebadores y sondas de ácido nucleico, polipéptidos, 10 y anticuerpos, para utilizar, por ej., como reactivos de diagnóstico están disponibles (Molecular Probes (2003) *Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) *Catalogue*, St. Louis, MO).

Se describen métodos convencionales de histología del sistema inmune (ver, por ej., Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and* 15 *Pathology*, Springer Verlag, New York, NY; Hiatt, *et al.* (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, PA; Louis, *et al.* (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, New York, NY).

Se encuentran disponibles paquetes de programas informáticos y bases de datos para determinar, por ej., fragmentos antigénicos, secuencias líderes, 20 plegado de proteínas, dominios funcionales, sitios de glicosilación y alineaciones de secuencias (ver, por ej., GenBank, Vector NTI[®] Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher[®] (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne *et al.* (2000) *Bioinformatics* 16: 741-742; Menne *et al.* (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16:741-742; Wren 25 *et al.* (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181; von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690).

Ejemplo 2

Optimización de Secuencia de Anticuerpos Anti-TSLP para Evitar Problemas de Desamidación

Un anticuerpo humanizado que se une a TSLP humana y cyno TSLP fue descrito en la Publicación de Patente Internacional WO2008/076321. Luego de análisis adicional de esta secuencia, el inventor identificó que la CDR-H2 de este anticuerpo contiene dos residuos de asparagina (N) en posiciones 61 y 63 de SEC ID NO: 4 de WO2008/076321 los cuales podrían potencialmente desamidar y de ese modo interrumpir la estructura del anticuerpo causando, potencialmente, problemas severos no intencionados que afectan a la seguridad y/o eficacia del anticuerpo. A fin de evitar estos problemas, los inventores crearon un anticuerpo mejorado que evita estos problemas de desamidación, aunque preservaron la afinidad para TSLP humana y cyno TSLP y evitaron problemas adicionales relacionados con la inmunogenicidad. Este anticuerpo mejorado comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable de SEC ID NO:7. La CDR-H2 de esta secuencia de aminoácidos corresponde a SEC ID NO:2.

La Figura 1 proporciona una alineación de SEC ID NO:11 de la presente solicitud contra SEC ID NO:14 de WO2008/076321 (es decir, una alineación de las cadena pesadas del anticuerpo reivindicado en esta invención y el anticuerpo descrito en WO2008/076321. En la Figura 1, la "Secuencia 1" corresponde a SEC ID NO:11 de la presente solicitud y la "Secuencia 2" corresponde a SEC ID NO:14 de WO2008/076321. En el anticuerpo reivindicado en esta invención, la asparagina (N) en posición 61 de SEC ID NO: 14 de WO2008/076321 fue cambiada por alanina (A) y la asparagina en posición 63 de SEC ID NO: 14 fue cambiada a lisina (K). Estos cambios fueron realizados para evitar la potencial desamidación de estos residuos. Por añadidura, la lisina (K) en posición 65 de SEC ID NO: 4 de WO2008/076321 fue cambiada a Glutamina (Q). Este cambio

fue realizado para disminuir las posibilidades de crear inmunogenicidad. Se realizó un cambio adicional en posición 72 de SEC ID NO: 14 de WO2008/076321, donde una treonina (T) fue cambiada a una alanina (A). Este cambio fue realizado para mejorar la afinidad de unión del anticuerpo.

5 Se ha descubierto, sorprendentemente, que los cambios en CDR-H2 no afectaron sustancialmente la afinidad de unión del anticuerpo resultante.

Un vector que contiene los genes que codifican la cadena pesada y ligera del anticuerpo descrito en esta invención fue depositado en la ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, el 17 de noviembre, 2009 y recibió el
10 Nº de Depósito de ATCC PTA-10482. Este depósito fue realizado bajo las condiciones proporcionadas por el Tratado de Budapest. Las secuencias de ácido nucleico que codifican las cadenas ligera y pesada (incluyendo péptidos de señal) están en un único plásmido, y ambos genes son expresados del promotor de citomegalovirus humano (CMV). El plásmido también contiene un gen resistente a
15 ampicilina para la selección en células de mamífero y un gen DHFR para la amplificación génica..

Ejemplo 3

Determinación de la Constante de Disociación en Equilibrio (K_D) para TSLP
20 Anti-humana Humanizada Utilizando Tecnología KinExA

La constante de disociación en equilibrio (K_D) se determinó utilizando el instrumento KinExA 3000 (Sapidyne Instruments Inc., www.sapidyne.com). El KinExA utiliza el principio del método de Ensayo Cinético de Exclusión basado en la medición de la concentración de anticuerpo no completado en una mezcla de
25 anticuerpo, antígeno y completo anticuerpo- antígeno. La concentración de anticuerpo libre se mide exponiendo la mezcla a un antígeno inmovilizado en fase sólida durante un período muy breve de tiempo. En la práctica, esto se logra



dejando fluir la mezcla de antígeno- anticuerpo en fase de solución pasando por las partículas recubiertas con antígeno atrapadas en una célula de flujo. Los datos generados por el instrumento son analizados utilizando software habitual. Las constantes en equilibrio son calculadas utilizando una teoría matemática

5 basada en las siguientes presunciones:

1. La unión sigue la ecuación de unión reversible para equilibrio:

$$k_{\text{encendido}} [\text{Ab}] [\text{Ag}] = k_{\text{apagado}} [\text{AbAg}]$$

2. Anticuerpo y antígeno se unen 1:1 y anticuerpo total es igual al complejo
10 antígeno- anticuerpo más anticuerpo libre.

3. La señal del instrumento está linealmente relacionada con la concentración de anticuerpo libre.

Materiales

15 Anticuerpos:

- Anticuerpo 1: Anticuerpo de rata parental 23B12
- Anticuerpo 2: MAb Anti TSLP hu humanizado 23B12 (que comprende la cadena pesada de SEC ID NO:14 y la cadena ligera de SEC ID NO:16 de WO2008/076321)
- 20 • Anticuerpo 3: mAb 23B12 anti TSLP hu humanizado (que comprende la cadena pesada de SEC ID NO:14 con una mutación en posición 72 de T a A, y la cadena ligera de SEC ID NO:16 de WO2008/076321
- Anticuerpo 4: mAb 23B12 anti TSLP hu humanizado (que comprende la cadena pesada de SEC ID NO:11 y la cadena ligera de SEC ID NO:12 de
25 la presente solicitud)

Antígenos:

- TSLP humana recombinante

Antígenos biotinilados:

- TSLP humana biotinilada

Otros reactivos:

- partículas PMMA, 98 micrones (Sapidyne, Cat No. 440198)
- Neutravidina (Pierce, Cat No. 31000)
- IgG anti-rata de Cabra conjugada a Cy5 (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Cat. No 112-175-167, Lote 60306)
- Anti-IgG hu de Cabra conjugada a Cy5 (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories Cat. No 109-175-088, lote 49069 y lote 58552)

Condiciones experimentales:

- 10 Las partículas de PMMA fueron recubiertas con TSLP humana biotinilada de acuerdo con Sapidyne "Protocol for coating PMMA particles with biotinylated ligands having short or nonexistent linker arms" ("Protocolo para recubrir partículas de PMMA con ligandos biotinilados que tienen brazos ligantes cortos o no existentes"). Todos los procedimientos experimentales se realizaron de
- 15 acuerdo con el manual de KinExA 3000. Todas las operaciones se realizaron por duplicado.

Se emplearon las siguientes condiciones:

Volumen de muestra: 2 mL

Índice de flujo de muestra: 0,25 mL/min

20 Volumen de etiqueta: 1 mL

Índice de flujo de etiqueta: 0,25 mL/min

Anticuerpo conc.: 0,1 nM

Conc. de antígeno más alta: 10 nM

Conc. de antígeno más baja: 10 pM

5

10

15

Afinidad de Anticuerpos para TSLP Humana y Cino

Las actividades cinéticas de unión de los anticuerpos de TSLP antihumanos de rata parental y diversos anticuerpos derivados humanizados contra TSLP humana (hu) y de mono *Cynomolgus* (cyno) se midieron por resonancia de plasmón superficial utilizando un sistema BIAcore T100 (BIAcore AB, Upsalla, Suecia). Aproximadamente 100RUs de TSLP humana o TSLP cyno se inmovilizaron por medio de química de acoplamiento de aminas sobre un Chip Sensor CM5 (grado de investigación, BR-1006-68). Se empleó buffer HBS-EP (BR-1006-69) como el buffer de corridas con un índice de flujo de 30µL/min. Se inyectaron anticuerpos 23B12 de rata y humanizados en concentraciones variables que oscilan entre 0,82 y 600 nM sobre las superficies de TSLP hu o cyno inmovilizadas a una velocidad de flujo de 30µL/min. Luego de cada ciclo de inyección, se regeneró la superficie del chip CM5 utilizando una serie de soluciones (Glicina 10 mM pH 1,5 y NaOH 25 mM respectivamente) a una velocidad de flujo de 75µL/min.

15

20

TSLP	KD (pM)			
	Anticuerpo 1	Anticuerpo 2	Anticuerpo 3	Anticuerpo 4
humana	141	No determinado	No determinado	172
humana	130	150	128	No determinado
humana	No determinado	No determinado	No determinado	155, 142, 339, 170, 153
humana*	No determinado	No determinado	No determinado	339
humana*, **	No determinado	No determinado	No determinado	299
cyno	159	No determinado	No determinado	138, 80, 115
cyno	No determinado	No determinado	No determinado	127
cyno **	No determinado	No determinado	No determinado	381

25

Anticuerpo 1:	Anticuerpo de rata parental 23B12
Anticuerpo 2:	mAb 23B12 anti TSLP hu humanizado (que comprende la cadena pesada de SEC ID NO:14 y la cadena ligera de SEC ID NO:16 de WO2008/076321)
Anticuerpo 3:	mAb 23B12 anti TSLP hu humanizado (que comprende la cadena pesada de SEC ID NO:14 con una mutación en posición 72 de T a A; y la cadena ligera de SEC ID NO:16 de WO2008/076321)
Anticuerpo 4:	mAb 23B12 anti TSLP hu humanizado (que comprende la cadena pesada de SEC ID NO:11 y la cadena ligera de SEC ID NO:12 de la presente solicitud)

Ejemplo 5

Bioensayo de Proliferación para la Evaluación de Anticuerpo Anti-TSLP Neutralizante

La capacidad de los diversos anticuerpos anti-TSLP de neutralizar biológicamente TSLP humana y cyno fue evaluada por la aplicación de bioensayos de proliferación a corto plazo que utilizan células las cuales expresan receptores de TSLP humana y cyno recombinante. Las células Ba/F3-TSLPR-IL7Ra transfectantes proliferan como respuesta a TSLP y la respuesta puede ser inhibida por un anticuerpo anti-TSLP neutralizante. Cada anticuerpo fue titulado contra una concentración de TSLP escogida dentro de la región lineal de la curva de respuesta a la dosis de TSLP, casi nivelada y por encima de la EC₅₀ de TSLP. La proliferación, o falta de la misma, se mide por medios colorimétricos utilizando Azul Alamar, un tinte indicador del crecimiento basado en la detección de la actividad metabólica. La capacidad de un anticuerpo de neutralizar TSLP se evalúa por su valor de EC₅₀, o concentración de anticuerpo que induce la inhibición máxima media de la proliferación de TSLP.

Los transfectantes Ba/F3 se mantienen en medio RPMI-1640, suero de ternero fetal 10%, 50 µM de 2-mercaptoetanol, L-Glutamina 2 mM, 50 µg/mL de penicilina- estreptomycin, y 10 ng/mL de IL-3 de ratón.

Los bioensayos de proliferación de Ba/F3 se llevan a cabo en medio RPMI-1640, suero de ternero fetal 10%, 50 µM de 2-mercaptoetanol, L-Glutamina 2 mM, y 50 µg/mL de penicilina - estreptomycin.

El ensayo se lleva a cabo en placas de fondo plano de 96 pocillos (Falcon 3072 o similar). Todas las preparaciones de reactivos y suspensiones celulares utilizan el medio de bioensayo adecuado. El volumen de ensayo es 150 µL por pocillo. Las titulaciones de un anticuerpo anti-TSLP se incuban previamente con TSLP durante 30-60 minutos a temperatura ambiente, tiempo durante el cual se preparan las células. Se agregan células a las placas luego de la incubación

previa de anticuerpo- citoquina. Las placas de bioensayo se incuban en una cámara de cultivo tisular humidificada (37C, 5% CO₂) durante 40-48 horas. Al final del tiempo de cultivo, se agrega Azul Alamar (Biosource Cat #DAL1100) y se deja desarrollar durante 8-12 horas. Luego se lee la absorbancia a 570 nm y 600 nm
5 (Lector de Microplacas VERSAmax, Molecular Probes), y se obtiene una OD₅₇₀₋₆₀₀. Se recomiendan duplicados o triplicados.

Las células son empleadas en un estado de crecimiento sano, generalmente en densidades de $3-8 \times 10^5$ /mL. Las células se cuentan, se peletizan, se lavan dos veces en medio de bioensayo, y se suspenden hasta la
10 densidad apropiada para la colocación en placas.

Se preparó TSLP hasta la concentración de trabajo y se agregó al primer pocillo a 75 µL. Se realizaron diluciones seriadas de 1:3 titulando 25:50 µL en medio de bioensayo a través de los pocillos, dejando 50 µL/pocillo. Las células se suspendieron hasta la densidad apropiada para plaquear a 100 µL por cada
15 pocillo.

El anticuerpo se preparó hasta la concentración de trabajo y se agregó al primer pocillo a 75 µL. Se realizaron diluciones seriadas de 1:3 por titulación de 25:50 µL en medio de bioensayo a través de los pocillos, dejando 50 µL por pocillo. Se agregó TSLP a la concentración apropiada a 50 µL por pocillo a los
20 pocillos que contienen el anticuerpo titulado. Las células fueron suspendidas hasta la densidad adecuada para plaquear a 50 µL por pocillo, y se agregaron luego de la preincubación de anticuerpo- citoquina.

Utilizando el programa informático GraphPad Prism 3.0, se trazó la absorbancia contra la concentración de citoquina o anticuerpo y se determinaron
25 los valores de EC50 utilizando regresión no lineal (ajuste de curva) de la respuesta a la dosis sigmoidal.

5

Tabla 5

10

15

20

25

	Bioensayo (pM) transfectante Ba/F3	
	hTSLP (SD)	cTSLP (SD)
Anticuerpo 1	120 (37)	528 (242)
Anticuerpo 4	214 (80)	691 (274)

Ejemplo 6

Actividad Neutralizante de Anticuerpos Anti-TSLP sobre la Producción de TARC Inducida por TSLP por Células Dendríticas Primarias Humanas

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, según siglas en inglés) de las capas leucocitarias obtenidas de donantes de sangre sanos (Stanford Medical School Blood Center, Stanford, CA) por centrifugación Ficoll y las Células Dendríticas CD11c⁺ fueron obtenidas por MACS (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) utilizando selección negativa seguido por clasificación celular utilizando una FACS. Se obtuvieron células de linaje negativo (Lin⁻) por 5 depleción de MACS de células T, células B, células NK, glóbulos rojos y monocitos de PBMC utilizando mAb CD3 anti-humano de ratón (OKT3, DNAX) y mAb anti-CD16 de ratón y perlas magnéticas recubiertas con IgG anti-ratón de cabra (Miltenyi Biotech), y utilizando perlas magnéticas directamente recubiertas con mAbs anti-CD19, CD56 y CD14 (Miltenyi Biotech). Posteriormente, las 10 células Lin⁻ se tiñeron con TC-anti-CD (Caltag, Burlingame, CA), PE-anti-CD11c y FITC-anti-CD3, -CD14, -CD19, -CD56, -CD16, y -CD20 (todos BD Biosciences, San Diego, CA) y CD11c⁺ DC clasificadas en un clasificador Vantage FACsorter™ (BD Biosciences) hasta una pureza > 99% de células Lin⁻ CD11c⁺ CD⁺.

20 Las CD CD11c⁺ CD⁺ fueron cultivadas inmediatamente luego de la clasificación en RPMI (Mediatech, Herndon, VA) que contenía 10% FCS y 1% piruvato (Mediatech), HEPES (Invitrogen, Grand Island, NY) y penicilina-estreptomicina (Mediatech). Las células se sembraron a $0,5 \times 10^6$ /ml en placas de 96 pocillos con fondo plano en presencia de medio solo, TSLP (15 ng/ml, DNAX), 25 o en una combinación de TSLP y el mAb anti-TSLP neutralizante (clon 23B12) o un anticuerpo monoclonal anti-TSLPR o un IgG2a de rata control de isotipo (R&D Systems, Minneapolis, MN). Los sobrenadantes de cultivo de DC (células

72

dendríticas) se recogieron después de 24 h de cultivo, se almacenaron congelados a -20 °C y se analizaron para determinar los niveles de proteína TARC por ELISA (R&D Systems).

Los resultados son resumidos en la Tabla 7. Los resultados de 5 experimentos individuales se muestran en líneas separadas.

Tabla 7

TSLP	EC 50 (µg/ml)	
	Anticuerpo 1	Anticuerpo 4
humana	0,12	0,16
humana	0,0069	0,0077
humana	0,031	0,060
humana (R&D)*	0,050	0,102, 0,126
humana (R&D)*	0,113	0,067, 0,173
humana (R&D)*	0,228	0,424
humana (R&D)*	0,404	0,164

* Estos experimentos utilizaron TSLP adquirida de R&D y expresada en E. coli. Los otros experimentos se llevaron a cabo con TSLP expresada en células HEK293.

10 Anticuerpo 1: Anticuerpo de rata parental 23B12
 Anticuerpo 4: mAb 23B12 anti TSLP hu humanizado (que comprende la cadena pesada de SEC ID NO:11 y la cadena ligera de SEC ID NO:12 de la presente solicitud)

15 En la Tabla 8 se proporciona un resumen de los resultados presentados en la Tabla 7 incluyendo los valores promedios y SD (desviación estándar).

Tabla 8

	Bioensayo (pM)	
	Producción de TARC por DCs (células dendríticas) humanas	
	hTSLP (SD)	hTSLP* (SD)
Anticuerpo 1	345 (389)	1312 (1025)
Anticuerpo 4	492 (502)	1161 (843)

20 * Estos experimentos emplearon TSLP adquirida en R&D y expresada en E. coli. Los otros experimentos se llevaron a cabo con TSLP expresada en células HEK293.

Ejemplo 7

Actividad Neutralizante de Anticuerpos Anti-TSLP Sobre la Producción de MDC Inducida por TSLP por Esplenocitos de Mono Cynomolgus

Se prepararon suspensiones de esplenocitos totales de bazo de mono Cynomolgus mediante disrupción del tejido y haciéndolo pasar a través de un tamiz de tejido de acero inoxidable de malla 50 (Bellco) seguido por pasaje a través de un filtro celular de Nylon de 70 micrometros (BD Falcon). Las suspensiones celulares se lavaron en DPBS mediante centrifugación y los pellets celulares se resuspendieron en Buffer de Lisis ACK precalentado a 37°C (BioWhittaker) para lisar Glóbulos Rojos y se incubaron durante 5 minutos a 37°C. Las células se diluyeron en DPBS, se lavaron dos veces y se resuspendieron en medio de cultivo.

Los esplenocitos se cultivaron en RPMI (Mediatech, Herndon, VA) que contenía 10% de FCS y 1% de piruvato (Mediatech), HEPES (Invitrogen, Grand Island, NY) y penicilina- estreptomycin (Mediatech). Las células se sembraron a 1,0 x 10⁶/ml en placas de 96 pocillos de fondo plano en presencia de medio solo, TSLP (0,1 ng/ml), o en una combinación de TSLP y el mAb anti-TSLP neutralizante (Anticuerpo 1 o Anticuerpo 4). Los sobrenadantes de cultivo de esplenocitos se recogieron después de 120 h de cultivo, se almacenaron congelados a -20°C y se analizaron para determinar los niveles de proteína MDC por un ELISA de MDC humanas (R&D Systems).

Los resultados son sintetizados en la Tabla 9. Los resultados de experimentos individuales se muestran en líneas separadas.

Tabla 9

TSLP	IC 50 (ug/ml)	
	Anticuerpo 1	Anticuerpo 4
cyno	0,012	0,012
cyno	0,030	0,028, 0,008
cyno	0,018	0,054

72

cyno	0,033	0,023
------	-------	-------

Anticuerpo 1: Anticuerpo de rata parental 23B12
Anticuerpo 4: mAb 23B12 humanizado anti TSLP hu (que comprende la cadena pesada de
SEC ID NO:11 y la cadena ligera de SEC ID NO:12 de la presente solicitud)

5

Pueden realizarse muchas modificaciones y variaciones de esta invención sin apartarse de su espíritu y alcance, como será evidente para los expertos en la técnica. Las realizaciones específicas descritas en esta invención son ofrecidas a modo de ejemplo solamente, y la invención debe ser limitada por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance total de los equivalentes a los cuales dichas reivindicaciones tienen derecho; y la invención no debe ser limitada por las realizaciones específicas que han sido presentadas en esta invención a modo de ejemplo.

La citación de las publicaciones o documentos antes mencionados no tiene el propósito de ser una admisión que de cualquiera de los antes mencionados sea técnica anterior pertinente, ni constituye admisión alguna en cuanto al contenido o a la fecha de estas publicaciones o documentos. Las patentes estadounidenses y otras publicaciones a las cuales se ha hecho referencia en esta invención son incorporadas a la presente solicitud por referencia.

20

LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID NO:	Secuencia
1	GYIFTDYAMH
2	TFIPLLDTSDYAQKFQG
3	MGVTHSYVMDA
4	RASQPISISVH
5	FASQSIG
6	QQTFSLPYT
7	secuencia aminoacídica de cadena pesada variable QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYIFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGTFIPLLDTSDYAQK FQGRVTMTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARMGVTHSYVMDAWGQGTLVTVSS
8	secuencia aminoacídica de cadena ligera variable EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQPISISVHWHYQQKPGQAPRLLIYFASQSIGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTFSLPYTFGQGTKVEIKRT
9	secuencia de ácidos nucleicos que codifica cadena pesada variable cagggtgcagctggtgcagctctggcgccgaagtgaagaaacctggcgccctccgtgaaggtgtcctgcaaggcctccggctacatcttca ccgactacgccatgcactgggtccgcccaggctccaggacagggcctggaatggatgggcaccttcatccctctgctggacacctctga ctacgcccagaaattccagggcagagtaccatgaccgcccagacacctccacccctacatggaactgcggtccctgagatc cgacgacaccgccgtgtactactgcgcccggatggcggtgacacactctacgtgatggacgcttggggccagggcacccctggtcac cgtgtctctcc
10	secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena ligera variable gagatcgtgctgaccagtcctcctggcacctgtctctgtctcccgccgagagagccacccctgtcctgcccggcctccagcctatctcc atctccgtgcactggtatcagcagaagccaggacagggccctcggtgctgatctactcgtctctcagctctatctctggcatccctgaccg gttctccggctctggtcctggccaccgacttcacccctgaccatctcccggtggaacctgaggacttcgcccgtgtactactgccagcagac cttctccctgccttacaccttggccagggcaccaagggtggagatcaagcgtacg
11	secuencia aminoacídica de cadena pesada QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYIFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGTFIPLLDTSDYAQK FQGRVTMTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARMGVTHSYVMDAWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
12	secuencia aminoacídica de cadena ligera EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQPISISVHWHYQQKPGQAPRLLIYFASQSIGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTFSLPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13	secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena pesada cagggtgcagctggtgcagctctggcgccgaagtgaagaaacctggcgccctccgtgaaggtgtcctgcaaggcctccggctacatcttca ccgactacgccatgcactgggtccgcccaggctccaggacagggcctggaatggatgggcaccttcatccctctgctggacacctctga ctacgcccagaaattccagggcagagtaccatgaccgcccagacacctccacccctacatggaactgcggtccctgagatc cgacgacaccgccgtgtactactgcgcccggatggcggtgacacactctacgtgatggacgcttggggccagggcacccctggtcac cgtgtctctccgctagcaccaagggccctccgtgttccctctggcccttccccaagtctacctctggcgccaccgctgctctgggtgtct ggtcaaggactacttccctgagcctgtgacagtctcttgaactctggcgccctgacctccggcgtgacacacttccctgcccgtgtgagc ctagtggcctgtactccctgtcctccgtggtcacagtgccttcatcatccctgggcacccagacctacatctgcaactgaaccacaagcc ttcaacaccaagggtggacaagaagggtggagcctaagtctcgacaagaccacacctgtcctccatgcctgcccctgagctgctg ggcgccgacctccgtgttctgttccctcctaagcctaaggacaccctgatgatctccggaccctgaagtacctgctggtggtggac gtgtccacgaggaccagaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcctcgggagg aacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgtgcaccaggactggctgaacggcaaagaatacaagtgaagg tgtccaacaaggccctgctgcccctatcgaaaagaccatctccaaggccaaggccagccaagagaacctcagggttacacctg cctccctctcgggacgagctgaccaagaaccaggtgtccctgacatgcctggtcaagggttctacccttccgatacgccgtggagtg gagttaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccctcctgtgctggaactccgacggctccttctcgtactccaagctgacc gtggacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgttctcctgtcctggtgatgcagaggccctgcacaaccactacaccagaagtcc ctgtccctgtctcctggcaag



14	secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cadena ligera gagatcgtgctgacctagtcacctgtctctgtctccggcgagagagccacctgtcctgccgggacctccagcctatctcc atctccgtgcactgggtatcagcagaagccaggacaggccacctgggtgctgatctactcgcttctcagtctatctctggcatccctgaccg gttctccggctctggctccggcaccgacttcacctgacctctccggctggaaacctgaggactcgccgtgtactactgccagcagac cttctccctgccttacaccttcggccagggcaccaagggtggagatcaagcgtagcgtggccgctcctccgtgttcattctccctccctccg acgagcagctgaagtccggcaccgcctctgtcgtctgcctgctgaacaactctacctcgggaggccaagggtgcagtggaagggtga caacgccctgcagtccggcaactcccaggaatccgtcaccgagcaggactccaaggactctacctactccctgtcctccacctgacc ctgtccaaggccgactacgagaagcacaagggtgtacgcctgcgaagtgaccaccagggcctgtcatctccagtactaagctttca accggggcgagtgc
15	MAVLGLLFCLVTFPSCVLS
16	MAPVQLLGLLVFLPAMRC

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SCHERING CORPORATION

<120> ANTICUERPO ANTI-TSLP MODIFICADO POR TÉCNICAS DE INGENIERÍA GENÉTICA

<130> BP2009.7093

<140>

<141>

<150> 61/297.008

<151> 21-01-2010

<150> 61/258.051

<151> 04-11-2009

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 1

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

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 2

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

Gly

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

66

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

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

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

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

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

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

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

<210> 7
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

81

<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 9
caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccctc cgtgaagggtg 60
tcttgcaagg cctccggcta catcttcacc gactacgcca tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggacagg gcctggaatg gatgggcacc ttcacccctc tgctggacac ctctgactac 180
gccagaaat tccagggcag agtgaccatg accgcgcaca cctccacctc caccgcctac 240
atggaactgc ggtccctgag atccgacgac accgccgtgt actactgcgc ccggatgggc 300
gtgacacact cctacgtgat ggacgcttgg ggccagggca ccctggtcac cgtgtcctcc 360

<210> 10
<211> 327
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 10
gagatcgtgc tgaccagtc ccctggcacc ctgtctctgt ctcccggcga gagagccacc 60
ctgtcctgcc gggcctccca gcctatctcc atctccgtgc actggtatca gcagaagcca 120
ggacaggccc ctcggtctgt gatctacttc gcttctcagt ctatctctgg catccctgac 180
cggttctccg gctctggctc cggcaccgac ttcacctga ccatctcccg gctggaacct 240
gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag accttctccc tgccttacac cttcggccag 300
ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacg 327

<210> 11
<211> 450
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 11
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 13
<211> 1350
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 13
caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccctc cgtgaagggt 60
tcctgcaagg cctccggcta catcttcacc gactacgcca tgcactgggt cggccaggct 120

ccaggacagg gacctggaatg gatgggcacc ttcattccctc tgctggacac ctctgactac 180
 gccagaaat tccagggcag agtgaccatg accgccgaca cctccacctc caccgcctac 240
 atggaactgc ggtccctgag atccgacgac accgccgtgt actactgcgc ccggatgggc 300
 gtgacacact cctacgtgat ggacgcttgg ggccagggca ccttggtcac cgtgtcctcc 360
 gctagcacca agggcccttc cgtgttccct ctggccctt cctccaagtc tacctctggc 420
 ggcaccgctg ctctgggctg tctgggtcaag gactacttcc ctgagcctgt gacagtctct 480
 tggaactctg gcgcctgac ctccggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcagtctagt 540
 ggctgtact cctgtcctc cgtggtcaca gtgccttcat catccctggg caccagacc 600
 tacatctgca acgtgaacca caagccttcc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagcct 660
 aagtctgctg acaagacca cacctgtcct ccatgccctg cccctgagct gctgggcgga 720
 cctccgtgt tctgttccc tccaaagcct aaggacaccc tgatgatctc ccggaccct 780
 gaagtgcct gcgtgggtgt ggacgtgtcc cacgaggacc cagaagtga gttcaattgg 840
 tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc ctggggagga acagtacaac 900
 tccacctacc ggggtgtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 960
 gaatacaagt gcaagggtgt caacaaggcc ctgcctgccc ctatcgaaaa gaccatctcc 1020
 aaggccaagg gccagccaag agaacctcag gtgtacacc tgcctccctc tcgggacgag 1080
 ctgaccaaga accaggtgtc cctgacatgc ctggtaagg gcttctaccc ttccgatatc 1140
 gccgtggagt gggagtctaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac cctcctgtg 1200
 ctggactccg acggctcctt cttcctgtac tccaagctga ccgtggacaa gtcccgggtg 1260
 cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg cctgcacaa ccactacacc 1320
 cagaagtcctc tgtccctgtc tctggcaag 1350

<210> 14

<211> 642

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 14

gagatcgtgc tgaccagtc cctggcacc ctgtctctgt ctccggcga gagagccacc 60
 ctgtcctgcc gggcctcca gctatctcc atctccgtgc actggtatca gcagaagcca 120
 ggacaggccc ctgggtgct gatctacttc gcttctcagt ctatctctgg catccctgac 180
 cggttctccg gctctggctc cggcaccgac ttcacctga ccatctccc gctggaacct 240
 gaggacttcg ccgtgtacta ctgccagcag accttctccc tgccttacac ctccggccag 300
 ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gccgtcctt ccgtgttcat cttccctccc 360

tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc tctgtcgtct gcctgctgaa caacttctac 420
cctcgggagg ccaaggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagtcagg caactcccag 480
gaatccgtca ccgagcagga ctccaaggac tctacctact ccctgtcctc caccctgacc 540
ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaagtgac ccaccagggc 600
ctgtcatctc cagtgactaa gtctttcaac cggggcgagt gc 642

<210> 15
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

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

Val Leu Ser

<210> 16
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

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

Met Arg Cys



REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descrito y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma cómo la misma ha de ser llevada a la práctica se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

5

1. Un compuesto de unión que se une específicamente a TSLP humana que comprende una región variable de cadena pesada o su fragmento de unión a TSLP, comprendiendo dicha región variable de cadena pesada una secuencia de CDR-H2 que comprende SEC ID NO:2; y, opcionalmente, un
10 - segundo agente terapéutico.

2. El compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 1, el cual comprende además:

(i) una secuencia de CDR-H1 que comprende SEC ID NO: 1; y

(ii) una secuencia de CDR-H3 que comprende SEC ID NO: 3.

15 3. El compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 3, el cual comprende además una región variable de cadena ligera de anticuerpo o su fragmento de unión a TSLP.

4. El compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 4, en el cual dicha región variable de cadena ligera comprende:

20 (i) una secuencia de CDR-L1 que comprende SEC ID NO:4;

(ii) una secuencia de CDR-L2 que comprende SEC ID NO:5; y

(iii) una secuencia de CDR-L3 que comprende SEC ID NO:6.

5. Un compuesto de unión que se une específicamente a TSLP humana, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende
25 una secuencia seleccionada del grupo formado por:

(i) SEC ID NO: 7;

(ii) SEC ID NO:7 o una variante de la misma; y

(iii) una secuencia que tiene por lo menos 97% de homología con SEC ID NO: 7.

6. El compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 5, en el cual dicha variante comprende hasta 3 residuos de aminoácidos modificados.

5 7. El compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 5, en el cual dicha región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:7.

8. El compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además una región variable de cadena ligera.

10 9. El compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 8, en el cual dicha región variable de cadena ligera comprende una secuencia seleccionada del grupo formado por:

(i) SEC ID NO: 8;

(ii) SEC ID NO:8 o una variante de la misma; y

15 (iii) una secuencia que tiene por lo menos 97% de homología con SEC ID NO: 8.

10. El compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 8, en el cual dicha región variable de cadena ligera comprende SEC ID NO: 8.

20 11. Un ácido nucleico aislado que codifica la región variable de cadena pesada del compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 1.

12. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 ligado operativamente a secuencias de control que son reconocidas por una célula huésped cuando la célula huésped es transfectada con el vector.

25 13. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 12.

14. Un método para producir un polipéptido que comprende:



cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 13 en medio de cultivo bajo condiciones donde la secuencia de ácidos nucleicos es expresada, produciendo de ese modo polipéptidos que comprenden las regiones variables de cadena ligera y pesada; y

5 recuperar los polipéptidos de la célula huésped o medio de cultivo.

15. El compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto de unión es un anticuerpo humanizado o su fragmento de unión a TSLP.

16. El compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 1, donde el
10 compuesto de unión es un fragmento de anticuerpo de unión a TSLP seleccionado del grupo formado por Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')₂, y un diacuerpo.

17. Un método para suprimir una respuesta inmune en un sujeto humano que comprende administrar a un sujeto que lo necesita el compuesto de
15 unión de acuerdo con la reivindicación 1, o un fragmento del mismo de unión a TSLP, en una cantidad eficaz para bloquear la actividad biológica de TSLP.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 17, donde la respuesta inmune es una respuesta inflamatoria.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 17, donde el sujeto tiene
20 un trastorno seleccionado del grupo formado por rinosinusitis alérgica, asma alérgica, conjuntivitis alérgica, o dermatitis atópica.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 17, donde el sujeto tiene asma.

21. Una composición que comprende el compuesto de unión de
25 acuerdo con la reivindicación 1 en combinación con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

22. El compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto de unión bloquea la actividad mediada por TSLP.

23. El compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho compuesto de unión es capaz de bloquear la unión de TSLP al TSLPR en
5 un ensayo de bloqueo cruzado.

24. El uso del compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 1, o de un fragmento de unión a TSLP del mismo, para la preparación de un medicamento para suprimir una respuesta inmune.

25. El uso del compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 1, o
10 de un fragmento de unión a TSLP del mismo, para la preparación de un medicamento para tratar la inflamación.

26. El uso del compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 1, o de un fragmento de unión a TSLP del mismo, para la preparación de un medicamento para tratar la inflamación alérgica.

15 27. El uso del compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 1, o de un fragmento de unión a TSLP del mismo, para la preparación de un medicamento para tratar la rinosinusitis alérgica, asma alérgica, conjuntivitis alérgica, o dermatitis atópica.

28. El uso del compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 1, o
20 de un fragmento de unión a TSLP del mismo, para la preparación de un medicamento para tratar el asma.

29. El compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto de unión es un anticuerpo que comprende SEC ID NO:11 y SEC ID NO:12.

25 30. El compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto de unión puede ser expresado del vector depositado bajo el N° de Depósito de ATCC PTA-10482.



31. El compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto de unión comprende una cadena pesada que puede ser expresada del vector depositado bajo el N° de Depósito de ATCC PTA-10482.

32. El compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 1, donde el
5 compuesto de unión comprende una región variable de cadena pesada que puede ser expresada del vector depositado bajo el N° de Depósito de ATCC PTA-10482.

33. El compuesto de unión de acuerdo con la reivindicación 1, donde el
10 compuesto de unión comprende las regiones CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del anticuerpo expresado por el vector depositado bajo el N° de Depósito de ATCC PTA-10482.

34. El ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicho ácido nucleico codifica la región variable de cadena pesada codificada por el vector depositado bajo el N° de Depósito de ATCC PTA-10482.

15 35. El vector de expresión depositado bajo el N° de Depósito de ATCC PTA-10482.

36. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 35.

p. de: SCHERING CORPORATION

RESUMEN

La invención se refiere a compuestos de unión que se unen específicamente a TSLP humana, así como también se refiere a sus usos, por
5 ej., en el tratamiento de trastornos inflamatorios y respuestas inflamatorias alérgicas.

Secuencia 1 20 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY1FTDYAMHWRQAPGGLEWMGTFIPLLDTSDY
Secuencia 2 1 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY1FTDYAMHWRQAPGGLEWMGTFIPLLDTSDY

Secuencia 1 80 ACKFQGRVTMTADTSTSTAYMELRSLRSDDAVYYCARMGVTHSYVMDAKGGTLVTVSS
Secuencia 2 61 NGNFKGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDAVYYCARMGVTHSYVMDAKGGTLVTVSS
* * * * *

Secuencia 1 140 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
Secuencia 2 121 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

Secuencia 1 200 GLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPPELLGG
Secuencia 2 181 GLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPPELLGG

Secuencia 1 260 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
Secuencia 2 241 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN

Secuencia 1 320 STYRVVSVLTVHLQDHLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
Secuencia 2 301 STYRVVSVLTVHLQDHLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE

Secuencia 1 380 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
Secuencia 2 361 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW

Secuencia 1 440 QQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
Secuencia 2 421 QQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

1/1

FIG. 1





PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference BP2009.7093	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US 10/55062	International filing date (day/month/year) 02 November 2010 (02.11.2010)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 04 November 2009 (04.11.2009)
Applicant SCHERING CORPORATION		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

☒ the international application in the language in which it was filed.

☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1

☒ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

99

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US 10/55062
--

Box No. 1	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished: a. (means) ☐ on paper ☒ in electronic form b. (time) ☐ in the international application as filed ☐ together with the international application in electronic form ☒ subsequently to this Authority for the purposes of search 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments: GenCore 6.3: SEQ ID NOs: 1-8,11,12	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/55062

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12P 21/08; C12N 5/07 (2010.01) USPC - 530/388.23; 435/335 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) USPC- 530/388.23; 435/335		
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 practicable, search terms used) Electronic data bases: PubWEST (PGPB, USPT, EPAB, JPAB); Google Scholar: antibody, monoclonal, thymic stromal lymphopoietin (TSLP), humanized, heavy chain variable, light chain variable. GenCore 6.3: SEQ ID NOS: 1-8, 11-12		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/076321 A1 (PRESTA et al.) 26 June 2008 (26.06.2008) SEQ ID NOS: 7, 10, 14, 16; Pg 6 para 6, pg 39 para 3, pg 40 para 2, pg 41 para 3	5, 8-10, 37
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 5 January 2011 (05.01.2011)	Date of mailing of the international search report 04 FEB 2011	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

91

From the INTERNATIONAL BUREAU

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

To:

TRIOLO, Thomas, A.
Merck & Co., Inc.
126 East Lincoln Avenue
Rahway, NJ 07065
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 14 September 2011 (14.09.2011)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference BP2009.7093	
International application No. PCT/US2010/055062	International filing date (day/month/year) 02 November 2010 (02.11.2010)

1. The following indications appeared on record concerning: ☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative		
Name and Address SCHERING CORPORATION 126 East Lincoln Avenue RY60-30 Rahway, NJ 07065 United States of America	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 SCHERING CORPORATION 2000 Galloping Hill Road Kenilworth, New Jersey 07033 United States of America	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 Preliminary Examining Authority ☐ the International Searching Authority ☒ the designated Offices concerned ☐ the Authority(ies) specified for supplementary search ☐ the elected Offices concerned ☐ other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Blanc Veronique e-mail pt04.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 04
Facsimile No. +41 22 338 82 70	



No. 12-068980-00000-0000

Fecha: 2012-04-26 16:42:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 91

PATENTE DE INVENCION

☐

MODELO DE U

☐
☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita una patente.

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

☐