

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 978**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2014** **PCT/JP2014/071008**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015** **WO15020193**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2014** **E 14833804 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019** **EP 3031913**

54 Título: **Anticuerpo anti-receptor de TSLP humana nuevo**

30 Prioridad:

09.08.2013 JP 2013165676

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
13.11.2019

73 Titular/es:

ASTELLAS PHARMA INC. (100.0%)
5-1, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku
Tokyo 103-8411, JP

72 Inventor/es:

SATO, HIROMU;
YAMAJUKU, DAISUKE;
ARAI, KAZUNORI y
OGINO, MAKU

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 730 978 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-receptor de TSLP humana nuevo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana nuevo.

10 **Técnica anterior**

La linfopoyetina del estroma tímico (TSLP) es una citocina derivada de células del epitelio, que se produce en respuesta a estímulos proinflamatorios. Principalmente, la TSLP potencia una respuesta inflamatoria alérgica a través de la activación de células dendríticas y mastocitos. Las células dendríticas expresan el receptor de TSLP y la cadena α del receptor de IL-7 que son miembros de una familia de receptores hematopoyéticos, y la TSLP se une a un heterodímero que consiste en el receptor de TSLP y la cadena α del receptor de IL-7, activando de ese modo las células dendríticas. Las células dendríticas activadas por TSLP expresan quimiocinas inflamatorias tales como timo y quimiocinas reguladas por activación (TARC (CCL17)), quimiocinas derivadas de macrófagos (MDC (CCL22)) y similares (Nat. Immunol., 2002, vol. 7, p. 673 a 680). Se sabe que TARC y MDC son quimiocinas Th2 y atraen células Th2 a un sitio de inflamación (Int. Immunol., 1999, vol. 11, p. 81 a 88). Además, las células dendríticas activadas por TSLP inducen fuertemente la diferenciación de células T vírgenes en células Th2, y las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-13 y $\text{TNF}\alpha$, y provocan la reacción inflamatoria (Nat. Immunol., 2002, vol. 7, p. 673 a 680).

Se ha notificado que la activación de las células dendríticas debido a TSLP mediante tal receptor de TSLP está implicada con patología de enfermedad, incluyendo enfermedades inflamatorias alérgicas tales como asma, y esclerosis sistémica.

Con respecto a asma, se ha notificado que en ratones transgénicos en los que la expresión de TSLP se potencia específicamente en un pulmón, la respuesta inflamatoria en una vía respiratoria está provocada acompañada por un aumento de la cantidad de IgE y las citocinas Th2 en un pulmón, y esto conduce a patología asmática (Nat. Immunol., 2005, vol. 6, p. 1047 a 1053). Además, en ratones con genes inactivados de receptor de TSLP o un modelo de asma al que se administra un anticuerpo anti-receptor de TSLP, se han observado la supresión de citocinas Th2 y producción de IgE en la sangre, y la mejora de la función respiratoria (J. Exp. Med., 2005, vol. 202, p. 829 a 839, y Clin. Immunol., 2008, vol. 129, p. 202 a 210). Además, en pacientes con asma, se ha notificado que expresiones de TSLP, TARC y MDC aumentan en las vías respiratorias asmáticas en correlación con la gravedad de la enfermedad (J. Immunol., 2005, vol. 174, p. 8183 a 8190, y J. Immunol., 2008, vol. 181, p. 2790 a 2798).

Con respecto a la esclerosis sistémica, se ha notificado que TSLP se sobreexpresa en la piel de pacientes con esclerosis sistémica (Arthritis Rheum., 2013, vol. 65, p. 1335 a 1346), y que la expresión de IL-13 e IL-17 en el sitio de inflamación de la piel se suprime casi completamente y la proporción de colágeno con respecto a histopatología se mejoró significativamente en un modelo de escleroderma inducido por bleomicina usando ratones con genes inactivados de receptor de TSLP (Ann. Rheum. Dis., 2013, vol. 72, p. 2018 a 2023).

Por consiguiente, cuando puede desarrollarse un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a receptor de TSLP humana e inhibe una acción de TSLP humana a través del receptor de TSLP humana, se espera que tal anticuerpo sea útil para prevenir y tratar diversas enfermedades en las que la TSLP humana y el receptor de TSLP humana están implicados en la patología de enfermedad.

Como anticuerpos contra el receptor de TSLP humana para los cuales se han realizado investigaciones hasta el momento, se han notificado 13H5 como anticuerpo monoclonal de ratón y hu13H5 como anticuerpo humanizado del mismo (documento de patente 1), 1D6.C9 como anticuerpo monoclonal de ratón y Nv115-3B-IgG1 y NV115-3B-IgG4 como anticuerpos quiméricos de los mismos (documento de patente 2), NV164-1 y NV163-1 como anticuerpos totalmente humanos (documento de patente 3), y TSLPR-012_141 como anticuerpo monoclonal humanizado derivado de un hámster.

En 13H5, se ha confirmado la actividad neutralizante en un ensayo de proliferación inducida por TSLP utilizando células Ba/F3 que expresan de forma estable el receptor de TSLP humana, pero la actividad neutralizante en hu13H5 no se ha confirmado todavía (documento de patente 1). Además, según la descripción de los documentos de patentes 2 a 4, entre los anticuerpos descritos en estos documentos, se reconoce que TSLPR-012_141 tiene la mayor actividad neutralizante (documentos de patentes 2 a 4). TSLPR-012_141 se ha evaluado a través de diversas pruebas de actividad neutralizante. Por ejemplo, en el ensayo de proliferación inducida por TSLP utilizando células Ba/F3 que expresan de forma estable el receptor de TSLP humana, el ensayo de producción de TARC, MDC e IL-8 inducido por TSLP utilizando células dendríticas derivadas de sangre periférica humana, el ensayo de producción de citocina Th2 inducida por TSLP utilizando células dendríticas derivadas de sangre periférica humana y sistemas de cocultivo de células T vírgenes, y similares, se ha confirmado que TSLPR-012_141 muestra la actividad neutralizante (documento de patente 4). Sin embargo, es deseable un anticuerpo que muestre una alta actividad neutralizante para ser utilizado como fármaco de anticuerpos.

Los principales factores que determinan la dosificación efectiva de un fármaco de anticuerpo incluyen la actividad de unión y actividad neutralizante del anticuerpo contra un antígeno, así como una cantidad del antígeno que está presente en el cuerpo. Un aumento de la actividad de unión y la actividad neutralizante conduce a una reducción en la dosificación, y como resultado, conduce a una reducción en la carga financiera y los gastos médicos de los pacientes, lo cual es una mejora extremadamente beneficiosa.

Por tanto, es necesario obtener un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana que tenga una actividad excelente en comparación con el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana convencional que va a usarse para prevenir y tratar diversas enfermedades.

Técnica relacionada

Documentos de patente

[Documento de patente 1] WO 2009/100324

[Documento de patente 2] WO 2007/112146

[Documento de patente 3] WO 2008/155365

[Documento de patente 4] WO 2012/007495

Divulgación de la invención

Problemas que va a resolver la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana que se una específicamente al receptor de TSLP humana e inhiba una acción de TSLP humana a través del receptor de TSLP humana.

Medios para resolver los problemas

Como resultado de una investigación intensiva sobre la producción del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana por los presentes inventores, se proporcionó un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 118 de la SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 108 de la SEQ ID NO: 3. Se reveló que el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana inhibía la expresión del ARNm de TARC y la producción de proteínas MDC inducida por TSLP (ejemplos 5 y 6), y suprimió una reacción alérgica en un modelo de sensibilización de antígeno de *Ascaris* de mono (ejemplo 7), completando así la presente invención.

Es decir, la presente invención incluye lo siguiente

[Punto 1] Un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo seleccionado de (1) o (2) a continuación:

(1) un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 118 de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 108 de SEQ ID NO: 3;

(2) Un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo en el que ácido glutámico del extremo N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de (1) se modifica a ácido piroglutámico.

[Punto 2] El anticuerpo anti-receptor de TSLP humana según el punto 1, que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 3.

[Punto 3] El anticuerpo anti-receptor de TSLP humana según el punto 1, que comprende la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 1, en el que el ácido glutámico del número de aminoácido 1 de SEQ ID NO: 1 se modifica a ácido piroglutámico y/o lisina del número de aminoácido 448 de SEQ ID NO: 1 se deleta, y la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 3.

[Punto 4] El anticuerpo anti-receptor de TSLP humana según el punto 3, que comprende una cadena pesada que

consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 447 de SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO. 3.

[Punto 5] Un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo según el punto 1(1) y un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo según el punto 1(1).

[Punto 6] Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo según el punto 1(1) y un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo según el punto 1(1).

[Punto 7] Una célula huésped seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente (a) a (d):

(a) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana según el punto 1(1) y un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo;

(b) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana según el punto 1(1) y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo;

(c) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana según el punto 1(1); y

(d) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana según el punto 1(1),

en el que la célula huésped expresa dicho anticuerpo.

[Punto 8] Un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo producido mediante un método que comprende cultivar una célula huésped para que exprese un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que la célula huésped es la célula huésped según el punto 7.

[Punto 9] Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo según el punto 1(1) y/o el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo según el punto 1(2), y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[Punto 10] La composición farmacéutica según el punto 9, que comprende el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana según el punto 2 y/o el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana según el punto 4, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[Punto 11] La composición farmacéutica según el punto 10, que es la composición farmacéutica para prevenir o tratar asma.

El anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de los puntos 1-4 y 8 incluye una fusión del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo y otro péptido o proteína, y una modificación que tiene un agente de modificación unido al mismo.

Efectos de la invención

El anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención se une al receptor de TSLP humana, tiene actividad neutralizante contra una acción de TSLP humana a través del receptor de TSLP humana, y puede usarse como agente para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias alérgicas tales como asma o esclerosis sistémica.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una acción inhibidora de T7-27 totalmente humano sobre la concentración de IgE específica de antígeno de *Ascaris* en un modelo de sensibilización de antígeno de *Ascaris* de mono. El eje vertical representa la concentración en plasma relativa de IgE específica de antígeno de *Ascaris* de muestras respectivas cuando se establece la concentración en plasma de IgE específica de antígeno de *Ascaris* en el día 22 de un individuo de entre

un grupo de vehículo en 2000 U/ml. Se muestran la concentración de IgE en el día 1 del grupo de vehículo y un grupo de administración de anticuerpo (antes de administrar un líquido de antígeno de *Ascaris* suspendido en gel de hidróxido de aluminio), concentración de IgE en el día 22 del grupo de vehículo y la concentración de IgE en el día 22 del grupo de administración de anticuerpo.

La figura 2 muestra una acción inhibitoria de T7-27 totalmente humano sobre una reacción cutánea específica del antígeno de *Ascaris* en un modelo de sensibilización de antígeno de *Ascaris* de mono. Se muestran los resultados de la administración de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y disolución de antígeno de *Ascaris* 100 µg/ml en el día 22. El eje vertical representa un valor (delta cm) en el que se resta un diámetro de una reacción cutánea mediante PBS de un diámetro de una reacción cutánea mediante la disolución de antígeno de *Ascaris*.

La figura 3 muestra una acción inhibitoria de un anticuerpo anti-receptor de TSLP sobre una reacción de hipersensibilidad de las vías respiratorias en un modelo de asma en ratones. El eje vertical representa un valor de PenH usado como índice de una función respiratoria (**p < 0,01, *p < 0,05, ###p < 0,01, #p < 0,05).

La figura 4 muestra una acción inhibitoria del anticuerpo anti-receptor de TSLP sobre la infiltración de eosinófilos en el modelo de asma en ratones. El eje vertical representa el número de eosinófilos en una suspensión de células de BALF (**p < 0,01).

La figura 5 muestra una acción inhibitoria del anticuerpo anti-receptor de TSLP sobre la expresión de ARNm de TARC en el modelo de asma en ratones. El eje vertical representa un nivel de expresión de ARNm de TARC.

Realizaciones para llevar a cabo la invención

A continuación en el presente documento, se describirá la presente invención en detalle.

Existen cinco clases de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE en un anticuerpo, y la estructura básica de una molécula de anticuerpo está configurada por cadenas pesadas que tienen un peso molecular de 50000 a 70000 y cadenas ligeras que tienen un peso molecular de 20000 a 30000 en cada una de las clases en común. Una cadena pesada consiste habitualmente en una cadena de polipéptido que comprende aproximadamente 440 aminoácidos, tiene una estructura distintiva para cada una de las clases, y se denomina Igγ, Igμ, Igα, Igδ e Igε correspondiente a IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Además, cuatro subclases de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 están presentes en IgG, y las cadenas pesadas respectivamente correspondientes a las mismas se denominan Igγ1, Igγ2, Igγ3, e Igγ4. Una cadena ligera consiste habitualmente en una cadena de polipéptido que comprende 220 aminoácidos, dos tipos de los cuales se conocen el tipo L y el tipo K, y se denominan Igλ e Igκ. En una configuración de péptido de la estructura básica de moléculas de anticuerpo, se unen dos cadenas pesadas homólogas y dos cadenas ligeras homólogas mediante enlaces disulfuro (enlace S-S) y enlaces no covalentes, y el peso molecular de la misma es de 150000 a 190000. Pueden emparejarse dos tipos de cadenas ligeras con cualquier cadena pesada. Las respectivas moléculas de anticuerpo consisten normalmente en dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas.

Con respecto a enlaces S-S entre cadenas, cuatro de los enlaces S-S están presentes en la cadena pesada (cinco en Igμ e Igε) y dos de ellos están presentes en la cadena ligera; se forma un bucle por 100 a 110 residuos de aminoácido, y esta estructura estérica es similar entre los bucles y se denomina unidad estructural o dominio. El dominio ubicado en el lado amino terminal (N terminal) en tanto la cadena pesada como la cadena ligera, cuya secuencia de aminoácidos no es constante incluso en el caso de una muestra de la misma clase (subclase) del mismo tipo de animal se denomina región variable, y los respectivos dominios se denominan región variable de cadena pesada (V_H) y región variable de cadena ligera (V_L). La secuencia de aminoácidos de un lado carboxilo terminal (C terminal) de la región variable es casi constante en cada clase o subclase y se denomina región constante (cada uno de los dominios se denomina C_H1, C_H2, C_H3 y C_L, respectivamente).

Un sitio de determinante antigénico de un anticuerpo está configurado por V_H y V_L, y la especificidad de unión depende de la secuencia de aminoácidos de este sitio. Por otro lado, actividades biológicas tales como unión a complementos y diversas células reflejan diferencias en las estructuras de la región constante entre cada clase de Ig. Se entiende que la variabilidad de las regiones variables de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas se limita principalmente a tres pequeñas regiones hipervariables presentes en ambas cadenas y estas regiones se denominan regiones determinantes de complementariedad (CDR: CDR1, CDR2 y CDR3 del lado N terminal). La porción restante de la región variable se denomina región de entramado (FR) y es relativamente constante.

Además, diversos tipos de fragmentos de unión a antígeno que comprenden V_H y V_L de un anticuerpo tienen actividad de unión a antígeno. Por ejemplo, se ejemplifica un fragmento variable de región de cadena individual (scFv), Fab, Fab' y F(ab')₂ como fragmentos de unión a antígeno típicos. Un Fab es un fragmento de unión a antígeno monovalente que está constituido con un fragmento de cadena ligera y de cadena pesada que incluye una V_H, una C_H1, y una porción de la región de bisagra. Un Fab' es un fragmento de unión a antígeno monovalente que está constituido con un fragmento de cadena ligera y de cadena pesada que incluye una V_H, una C_H1, y una porción de la región de bisagra, y se incluyen residuos de cisteína que constituyen el enlace S-S entre cadenas pesadas en

la porción de la región de bisagra. Un $F(ab')_2$ es un fragmento de unión a antígeno bivalente que tiene una estructura dimérica en la que dos fragmentos Fab' se unen entre sí por medio del enlace S-S entre cadenas pesadas en la región de bisagra. Un $scFv$ es un fragmento de unión a antígeno monovalente que está constituido con una V_H y V_L conectadas con un péptido ligador.

<Anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención>

Un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención es un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene las siguientes características.

Un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende la región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 118 de SEQ ID NO: 1, y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 108 de SEQ ID NO: 3.

Preferiblemente, el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención tiene las características descritas anteriormente y comprende además una región constante de cadena pesada y una región constante de cadena ligera. Como región constante, puede seleccionarse cualquier subclase de región constante (por ejemplo, una región constante de $Ig\gamma_1$, $Ig\gamma_2$, $Ig\gamma_3$ o $Ig\gamma_4$ como región constante de cadena pesada y una región constante de $Ig\lambda$, o $Ig\kappa$ como región constante de cadena ligera), pero la región constante de $Ig\gamma_1$ humana es preferible como región constante de cadena pesada y la región constante de $Ig\kappa$ humana es preferible como región constante de cadena ligera.

Una región constante de $Ig\gamma_1$ humana incluye, por ejemplo, región constante de $Ig\gamma_1$ humana que consiste en la secuencia de aminoácidos de números de aminoácido 119 a 448 de SEQ ID NO: 1.

Una región constante de $Ig\kappa$ humana incluye, por ejemplo, región constante de $Ig\kappa$ humana que consiste en la secuencia de aminoácidos de números de aminoácido 109 a 214 de SEQ ID NO: 3.

Como anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, se prefiere más el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera descritas anteriormente y en el que la región constante de cadena pesada es la región constante de $Ig\gamma_1$ humana y la región constante de cadena ligera es la región constante de $Ig\kappa$ humana.

En una realización, el fragmento de unión a antígeno de la presente invención es $scFv$, Fab , Fab' o $F(ab')_2$.

Cualquier experto en la técnica puede construir una fusión de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo y otro péptido o proteína y también puede construir una modificación que tiene un agente de modificación unido a la misma, usando un método conocido en el campo. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención incluye el anticuerpo y el fragmento de unión a antígeno del mismo en forma de tal fusión o modificación. Por ejemplo, un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende la región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 118 de SEQ ID NO: 1, y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 108 de SEQ ID NO: 3 incluye una fusión del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo y otro péptido o proteína, y una modificación que tiene un agente de modificación unido al mismo. El otro péptido o proteína usado para la fusión no está particularmente limitado, siempre que no reduzca la actividad de unión del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo; los ejemplos de los mismos incluyen albúmina sérica humana, diversos péptidos de etiqueta, péptido con motivo de hélice artificial, proteínas de unión a maltosa, glutatión S transferasa, diversas toxinas, otros péptidos o proteínas capaces de promover la multimerización, y similares. El agente de modificación usado para la modificación no está particularmente limitado, siempre que no reduzca la actividad de unión del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo; los ejemplos de los mismos incluyen polietilenglicol, cadenas de azúcares, fosfolípidos, liposomas, compuestos de bajo peso molecular, y similares.

En una realización, el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención es un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana que tiene las siguientes características.

Un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana que comprende la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 1 y la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 3.

En el caso en el que un anticuerpo se expresa en células, se sabe que el anticuerpo se modifica después de la traducción. Los ejemplos de modificación postraduccional incluyen cortar lisina de un extremo C-terminal de una

cadena pesada mediante carboxipeptidasa, modificación a ácido piroglutámico debido a piroglutamilación de ácido glutámico o glutamina de un extremo N-terminal de una cadena pesada o una cadena ligera, y similares. Se sabe que la lisina del extremo C-terminal de la cadena pesada se deleciona o una gran parte de la glutamina del extremo N-terminal de la cadena pesada se modifica a ácido piroglutámico (Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, vol. 97, p. 2426). Además, también se sabe que la modificación después de la traducción no influye en la actividad de un anticuerpo en el campo (Analytical Biochemistry, 2006, vol. 348, p. 24 a 39).

El anticuerpo de la presente invención incluye un anticuerpo modificado después de la traducción durante la expresión en células tales como un anticuerpo que comprende una cadena pesada que carece de lisina de un extremo C-terminal, un anticuerpo en el que glutamina o ácido glutámico del extremo N-terminal de la cadena pesada se modifica a ácido piroglutámico debido a piroglutamilación, y similares además de un anticuerpo que comprende una cadena pesada de longitud completa. Además, el fragmento de unión a antígeno de la presente invención incluye un fragmento de unión a antígeno modificado después de la traducción durante la expresión en células tales como un fragmento de unión a antígeno en el que glutamina o ácido glutámico del extremo N-terminal de la cadena pesada se modifica a ácido piroglutámico debido a piroglutamilación.

Por ejemplo, el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la invención incluye un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana descrito a continuación.

Un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana que comprende la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 1, en el que el ácido glutámico del número de aminoácido 1 de SEQ ID NO: 1 se modifica a ácido piroglutámico y/o lisina del número de aminoácido 448 de SEQ ID NO: 1 se deleciona, y la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 3.

La presente invención incluye un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene las siguientes características.

Un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de números de aminoácido 31 a 35 de SEQ ID NO: 1, CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de números de aminoácido 50 a 66 de SEQ ID NO: 1, y CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de números de aminoácido 99 a 107 de SEQ ID NO: 1, y la región variable de cadena ligera que comprende CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de números de aminoácido 24 a 34 de SEQ ID NO: 3, CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de números de aminoácido 50 a 56 de SEQ ID NO: 3, y CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de números de aminoácido 89 a 97 de SEQ ID NO: 3.

El anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención se une al receptor de TSLP humana. Si el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se une al receptor de TSLP humana se confirma usando un método de medición de la actividad de unión en la técnica relacionada. Los ejemplos del método de medición de la actividad de unión incluyen un método de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o un método de resonancia de plasmón superficial (SPR). En el caso de usar el ELISA, en un método a modo de ejemplo, una proteína de fusión del receptor de TSLP humana y Fc humana (proteína de fusión Fc humana-receptor de TSLP humana (que está codificada por la secuencia de base de SEQ ID NO: 5)) se inmoviliza sobre una placa de ELISA, y se añade un anticuerpo de prueba a lo mismo para hacerse reaccionar. Tras la reacción, se hace reaccionar un anticuerpo secundario tal como un anticuerpo anti-IgG o similares marcado con una enzima tal como peroxidasa del rábano (HRP), y se lava, y luego es posible confirmar si el anticuerpo de prueba se une al receptor de TSLP humana con medición de la actividad usando un reactivo que detecta la actividad (por ejemplo, en el caso de marcaje con HRP, sustrato de ELISA para quimioluminiscencia BM (POD) (Roche Diagnostics, Inc.)). En el caso de usar SPR, por ejemplo, es posible usar Biacore (marca registrada) 2000 (GE Healthcare Japan Corporation). En un método a modo de ejemplo, el anticuerpo de prueba se inmoviliza sobre una superficie de un chip sensor y una proteína de fusión de receptor de TSLP humana y Fc de ratón (receptor de TSLP humana-proteína de fusión Fc de ratón (que está codificada por la secuencia de base de SEQ ID NO: 6)) se añade a la trayectoria de flujo. Es posible confirmar si el anticuerpo de prueba se une al receptor de TSLP humana analizando la constante de velocidad de unión (k_a), constante de velocidad de disociación (k_d) y constante de disociación (KD) entre el anticuerpo y receptor de TSLP humana.

Además, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención incluye un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al receptor de TSLP derivado de otros animales (por ejemplo, receptor de TSLP de mono) y puede medirse la actividad de unión con respecto a los receptores usando el mismo método.

Preferiblemente, el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención se une al receptor de TSLP humana y tiene actividad neutralizante con respecto al receptor de TSLP humana. La actividad neutralizante con respecto al receptor de TSLP humana significa la actividad de inhibición de cualquier actividad biológica procedente de TSLP humana mediante unión al receptor de TSLP humana, y puede evaluarse basándose en una o varias actividades biológicas de TSLP humana a través de receptor

de TSLP humana como índice. Los ejemplos de tal actividad neutralizante incluyen una actividad inhibidora sobre la expresión de ARNm de TARC inducida por TSLP y una actividad inhibidora sobre la producción de proteína MDC inducida por TSLP usando células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), y los métodos descritos en los ejemplos 5 y 6 a continuación pueden usarse como método de evaluación específico de la actividad.

Para evaluar los efectos del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención en más detalle, puede usarse una prueba *in vivo*. Por ejemplo, tal como se describe en el ejemplo 7 a continuación, es posible evaluar los efectos del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana *in vivo* con una prueba de reacción antialérgica usando un modelo de sensibilización de antígeno de *Ascaris* de mono.

El anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención puede producirlo fácilmente un experto en la técnica usando un método conocido en el campo basado en información de secuencia sobre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la invención que se divulga en la presente memoria descriptiva. El anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención no está particularmente limitado, pero puede fabricarse según un método descrito en la sección de <Método de producción de anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la invención> a continuación.

El anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención se purifica además según sea necesario y se formula según un método convencional. Puede usarse para la prevención o el tratamiento de enfermedades en las que TSLP humana y el receptor de TSLP humana están implicados con patología de enfermedad, incluyendo enfermedades inflamatorias alérgicas tales como asma, y esclerosis sistémica.

<Un polinucleótido de la presente invención>

Un polinucleótido de la presente invención incluye un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención y un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención.

En una realización, el polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención es un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 118 de SEQ ID NO: 1.

Un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada mostrada por la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 118 de SEQ ID NO: 1 incluye, por ejemplo, un polinucleótido que comprende la secuencia de base de los números de base 1 a 354 de SEQ ID NO: 2.

En una realización preferida, el polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención es un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 1.

Un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 1 incluye, por ejemplo, un polinucleótido que comprende la secuencia de base mostrada por SEQ ID NO: 2.

En una realización, el polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención es un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 108 de SEQ ID NO: 3.

Un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 108 de SEQ ID NO: 3 incluye, por ejemplo, un polinucleótido que comprende la secuencia de base de los números de base 1 a 324 de SEQ ID NO: 4.

En una realización preferida, el polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención es un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 3.

Un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 3 incluye, por ejemplo, un polinucleótido que comprende la secuencia de base mostrada por SEQ ID NO: 4.

El polinucleótido de la presente invención puede producirse fácilmente por un experto en la técnica usando un método conocido en el campo basándose en la secuencia de base. Por ejemplo, el polinucleótido de la presente invención puede sintetizarse usando un método de síntesis de genes conocido en el campo. Un método de síntesis de genes incluye, por ejemplo, diversos métodos conocidos por un persona en la técnica, tal como un método de síntesis de genes de anticuerpo divulgado en el documento WO90/07861.

<Vector de expresión de la presente invención, célula huésped transformada de la presente invención, método de producción de anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención y anticuerpo anti-receptor de TSLP humana producido mediante el método>

Un vector de expresión de la presente invención incluye un vector de expresión que comprende el polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención y/o el polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención.

Los vectores de expresión preferidos de la presente invención incluyen un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención, un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la cadena ligera del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención, o un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención y un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la cadena ligera del anticuerpo.

El vector de expresión usado para expresar el polinucleótido de la presente invención no está particularmente limitado siempre que un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención y/o un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención pueda expresarse en diversas células huésped de células eucariotas (por ejemplo, células animales, células de insecto, células vegetales y levadura) y/o células procariotas (por ejemplo, *Escherichia coli*), y pueden producirse los polipéptidos codificados por estas. Los ejemplos del vector de expresión incluyen vectores plasmídicos, vectores virales (por ejemplo, adenovirus o retrovirus), y similares. Preferiblemente, pueden usarse pEE6.4 o pEE12.4 (Lonza, Inc.). Además, pueden expresarse genes de anticuerpo transfiriendo un fragmento génico de región variable a vectores de expresión que comprenden genes de región constante de Ig humana de antemano tales como AG- γ 1 o AG- κ (por ejemplo, véase el documento WO94/20632).

El vector de expresión de la presente invención puede incluir un promotor que está unido operativamente al polinucleótido de la presente invención. Los ejemplos del promotor para expresar el polinucleótido de la invención con células animales incluyen un promotor derivado de virus tal como CMV, VRS o VS40, un promotor de actina, un promotor 1 α de EF (factor de elongación) y un promotor de choque térmico. Los ejemplos de promotores para la expresión mediante bacterias (por ejemplo, *Escherichia*) incluyen un promotor trp, un promotor lac, promotor λ PL y promotor tac. Además, los ejemplos de promotores para la expresión por levadura incluyen un promotor GAL1, un promotor GAL10, un promotor PH05, un promotor PGK, un promotor GAP y un promotor ADH.

La célula huésped transformada de la presente invención incluye una célula huésped transformada con el vector de expresión de la presente invención que se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente (a) a (d):

(a) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención y el polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo;

(b) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención y un vector de expresión que comprende el polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo;

(c) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención; y

(d) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención, y la célula huésped expresa dicho anticuerpo.

En una realización, la célula huésped transformada de la presente invención es una célula huésped transformada

con el vector de expresión de la presente invención que se selecciona del grupo que consiste en lo siguiente (a) a (d):

(a) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención y un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la cadena ligera del anticuerpo;

(b) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la cadena ligera del anticuerpo;

(c) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención; y

(d) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la cadena ligera del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención, y la célula huésped expresa dicho anticuerpo

En el caso de usar una célula animal, una célula de insecto o levadura como célula huésped, el vector de expresión de la presente invención puede comprender codón de iniciación y codón de terminación. En este caso, el vector de expresión de la presente invención puede comprender una secuencia potenciadora, una región no traducida en el lado 5' y el lado 3' de genes que codifican para el anticuerpo de la presente invención o la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera, una secuencia de señal secretora, una unión de corte y empalme, un sitio de poliadenilación o una unidad replicable. Cuando se usa *Escherichia coli* como célula huésped, el vector de expresión de la presente invención puede comprender un codón de iniciación, un codón de terminación, una región terminadora y una unidad replicable. En este caso, el vector de expresión de la presente invención puede comprender un marcador de selección (por ejemplo, genes resistentes a tetraciclina, genes resistentes a ampicilina, genes resistentes a kanamicina, genes resistentes a neomicina o genes de dihidrofolato reductasa) que se usa generalmente según la necesidad.

Los ejemplos preferidos de la célula huésped transformada de la presente invención incluyen una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención y un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la cadena ligera del anticuerpo, y una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de base que codifica para la cadena ligera del anticuerpo.

La célula huésped transformada no está particularmente limitada siempre que la célula huésped sea apropiada para el vector de expresión que está usándose, transformada con el vector de expresión, y pueda expresar el anticuerpo. Los ejemplos de la célula huésped transformada incluyen diversas células tales como células naturales o células establecidas de manera artificial que se usan generalmente en el campo de la presente invención (por ejemplo, células animales (por ejemplo, células CHO-K1SV), células de insecto (por ejemplo, Sf9), bacterias (por ejemplo, *Escherichia*), levadura (por ejemplo, *Saccharomyces* o *Pichia*) o similares). Pueden usarse preferiblemente células cultivadas tales como células CHO-K1SV, células CHO-DG 44, células 293 o células NS0.

Un método de transformación de la célula huésped no está particularmente limitado pero, por ejemplo, puede usarse un método de fosfato de calcio o un método de electroporación.

Los métodos de producción del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente divulgación incluyen un método de producción del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende cultivar la célula huésped transformada de la presente invención para que exprese el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo.

El anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención incluyen un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo producido por el método de producción del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención.

El método de producción del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente divulgación no está particularmente limitado siempre que el método comprenda cultivar la célula huésped transformada de la presente invención para que exprese el anticuerpo anti-receptor de TSLP

humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo. La célula huésped preferida usada en el método incluye la célula huésped transformada de la presente invención que se describe anteriormente como ejemplo preferido.

La célula huésped transformada puede cultivarse mediante métodos conocidos. Las condiciones de cultivo, por ejemplo, la temperatura, el pH del medio de cultivo y el tiempo de cultivo se seleccionan apropiadamente. En el caso en el que la célula huésped es una célula animal, los ejemplos del medio de cultivo incluyen medio de cultivo MEM complementado con aproximadamente del 5% al 20% de suero bovino fetal (Science, 1959, vol. 130, n.º 3373, p. 432 a 7), medio de cultivo DMEM (Virology, 1959, vol. 8, p. 396) y medio de cultivo RPMI1640 (J. Am. Med. Assoc., 1967, vol. 199, p. 519), un medio de cultivo 199 (Exp. Biol. Med., 1950, vol. 73, p. 1 a 8). El pH del medio de cultivo es preferiblemente de aproximadamente 6 a 8, y el cultivo se lleva a cabo generalmente a aproximadamente de 30°C a 40°C durante aproximadamente de 15 horas a 72 horas mientras se ventila aire y se agita si es necesario. En el caso en el que la célula huésped es una célula de insecto, puede usarse como medio de cultivo, por ejemplo, medio de cultivo de Grace (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, vol. 82, p. 8404) complementado con suero bovino fetal. El pH del medio de cultivo es preferiblemente de aproximadamente 5 a 8, y el cultivo se lleva a cabo generalmente a aproximadamente de 20°C a 40°C durante aproximadamente de 15 horas a 100 horas mientras se ventila aire y se agita si es necesario. En el caso en el que la célula huésped es *Escherichia coli* o levadura, como medio de cultivo, por ejemplo, es apropiado medio de cultivo líquido complementado con una fuente de nutrientes. Es preferible que el medio de cultivo con nutrientes incluya una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno inorgánico o una fuente de nitrógeno orgánico necesaria para el crecimiento de la célula huésped transformada. Los ejemplos de la fuente de carbono incluyen glucosa, dextrano, almidón soluble y sacarosa y, los ejemplos de la fuente de nitrógeno inorgánica o la fuente de nitrógeno orgánica incluyen sales de amonio, sales de nitrato, aminoácidos, licor de maíz, peptona, caseína, extracto de carne, harina de soja y extracto de patata. Pueden incluirse otros nutrientes (por ejemplo, sales inorgánicas (por ejemplo, cloruro de calcio, dihidrogenofosfato de sodio y cloruro de magnesio), vitaminas), y antibióticos (por ejemplo, tetraciclina, neomicina, ampicilina y kanamicina) según se desee. El pH del medio de cultivo es preferiblemente de aproximadamente 5 a 8. En el caso en el que la célula huésped es *Escherichia coli*, los ejemplos preferidos del medio de cultivo incluyen medio de cultivo LB y medio de cultivo M9 (Mol. Clo., Cold Spring Harbor Laboratory, vol. 3, A2.2). El cultivo se lleva a cabo generalmente a aproximadamente de 14°C a 43°C durante aproximadamente de 3 horas a 24 horas mientras se ventila aire y se agita si es necesario. En el caso en el que la célula huésped es levadura, puede usarse como medio de cultivo, por ejemplo, medio mínimo Burkholder (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, vol. 77, p. 4505). El cultivo se lleva a cabo generalmente a aproximadamente de 20°C a 35°C durante de aproximadamente 14 horas a 144 horas mientras se ventila aire y se agita si es necesario. Al llevar a cabo el cultivo en la manera descrita anteriormente, es posible expresar el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención.

El método de producción del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente divulgación puede incluir recuperar, preferiblemente aislar o purificar el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la célula huésped transformada además de cultivar la célula huésped transformada de la presente invención para expresar el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos del método de aislamiento o purificación incluyen métodos que usan solubilidad tal como desalado y el método de precipitación con disolvente, métodos que usan la diferencia en peso molecular tal como diálisis, ultrafiltración y filtración en gel, métodos que usan una carga eléctrica tal como cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de hidroxilapatita, métodos que usan afinidad de especificidad tal como cromatografía de afinidad, métodos que usan la diferencia en hidrofobicidad tal como cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa, y métodos que usan la diferencia en el punto isoelectrónico tal como forensis de isoelectroenfoque. Preferiblemente, el anticuerpo acumulado en un sobrenadante de cultivo puede purificarse mediante diversas cromatografías, por ejemplo, cromatografía en columna usando columna de proteína A o columna de proteína G.

<Composición farmacéutica de la presente invención>

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención y excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica de la presente invención puede prepararse mediante un método que se usa generalmente con excipientes, es decir, excipientes para medicamentos o portadores para medicamentos que se usan generalmente en el campo. Los ejemplos de formas de dosificación de las composiciones farmacéuticas incluyen fármaco parenteral tal como un fármaco para inyección y un fármaco de infusión por goteo, y estos pueden administrarse mediante administración intravenosa, administración subcutánea, o similares. En la preparación de fármacos, pueden usarse excipientes, portadores y aditivos según las formas de dosificación dentro del intervalo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir varios tipos de anticuerpos anti-receptor de TSLP humana o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención. Por ejemplo, la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo en el que la lisina del extremo C-terminal de la cadena pesada se deletiona, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo con modificación postraducciona en el extremo N-terminal, un anticuerpo en el que la lisina del extremo C-terminal de la cadena pesada se deletiona y se realiza modificación postraducciona en el extremo N-terminal, y/o un

anticuerpo que tiene lisina del extremo C-terminal de la cadena pesada y no tiene modificación postraducciona en el extremo N-terminal.

Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención que comprende el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende dos o más tipos de los anticuerpos anti-receptor de TSLP humana entre (1) a (4) a continuación.

(1) El anticuerpo anti-receptor de TSLP humana, que comprende la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 447 de SEQ ID NO: 1, y la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 3.

(2) El anticuerpo anti-receptor de TSLP humana, que comprende la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 1 en el que el ácido glutámico del número de aminoácido 1 se modifica mediante ácido piroglutámico y la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 3.

(3) El anticuerpo anti-receptor de TSLP humana, que comprende la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 447 de SEQ ID NO: 1 en el que el ácido glutámico del número de aminoácido 1 se modifica mediante ácido piroglutámico y la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 3.

(4) El anticuerpo anti-receptor de TSLP humana, que comprende la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 1 y la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 3.

La cantidad de adición del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención varía en la preparación de fármacos según el grado de los síntomas de un paciente, la edad de un paciente, la forma de dosificación del fármaco que va a usarse, el título de unión del anticuerpo, o similares, y por ejemplo, puede usarse una cantidad de adición de aproximadamente 0,001 mg/kg a 100 mg/kg.

La composición farmacéutica de la presente invención puede usarse como una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades en las que están implicados TSLP humana y receptor de TSLP humana en patología de enfermedad, tal como asma.

La presente invención incluye una composición farmacéutica para prevenir o tratar asma que comprende el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención. Además, la presente invención incluye un método para prevenir o tratar asma, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención. Además, la presente invención incluye un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención, para su uso en la prevención o tratamiento de asma. Además, la presente invención incluye el uso del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención para la fabricación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar asma.

La presente invención se ha descrito generalmente y se proporcionarán ejemplos específicos a los que se hace referencia para una mejor comprensión, pero estos son meros ejemplos y la presente invención no se limita a los mismos.

Ejemplos

Con respecto a partes que usan kits o reactivos comercialmente disponibles, se realizan las pruebas según el protocolo adjunto a menos que se indique lo contrario. Además, por conveniencia, la concentración mol/l se expresa como M. Por ejemplo, una disolución de hidróxido de sodio acuosa 1 M significa 1 mol/l de una disolución de hidróxido de sodio acuosa.

(Ejemplo 1: Adquisición de proteína de fusión Fc-receptor de TSLP)

Para la evaluación de actividad de unión de un anticuerpo, una proteína de fusión de receptor de TSLP humana y Fc humana (proteína de fusión Fc humana-receptor de TSLP humana), una proteína de fusión de receptor de TSLP humana y Fc de ratón (proteína de fusión de Fc de ratón-receptor de TSLP humana), y se obtuvieron una proteína de fusión de receptor de TSLP de mono y Fc humana (proteína de fusión Fc humana-receptor de TSLP de mono). Se recombinaron respectivamente el gen de fusión Fc humana-receptor de TSLP humana (SEQ ID NO: 5), el gen de fusión Fc de ratón-receptor de TSLP humana (SEQ ID NO: 6), y el gen de fusión Fc de ratón-receptor de TSLP de mono (SEQ ID NO: 7) con vectores de expresión de células de mamífero, vectores GS (Lonza, Inc.) pEE12.4. Los vectores preparados se transfirieron genéticamente a células 293 FreeStyle (Life technologies, Inc) usando un reactivo de transferencia génica fectina 293 (Life technologies, Inc), y se cultivaron las células mediante un sistema

de cultivo libre de suero usando medio de expresión 293 FreeStyle (Life technologies, Inc) durante una semana, y luego se obtuvieron respectivamente sobrenadantes de cultivo que comprenden la proteína de fusión Fc humana-receptor de TSLP humana, la proteína de fusión de Fc de ratón-receptor de TSLP humana, y la proteína de fusión Fc humana-receptor de TSLP de mono. Se purificaron proteínas de fusión Fc-receptor de TSLP respectivas usando una

(Ejemplo 2: Adquisición de proteínas mutantes de TSLP-Flag)

Para la evaluación de la actividad neutralizante de un anticuerpo, se obtuvieron una proteína mutante de TSLP humana con etiqueta Flag (proteína mutante de TSLP humana-Flag) y una proteína mutante de TSLP de mono con etiqueta Flag (proteína mutante de TSLP de mono-Flag). Se recombinó respectivamente gen mutante de TSLP de humano o de mono-Flag (SEQ ID NO: 8 ó 9 (con el fin de evitar que se pierda la actividad cuando se corta mediante furina proteasa, se codificaron respectivamente secuencias de aminoácidos de TSLP de tipo natural de humano o de mono en la que se inserta una mutación en el sitio de corte) con vectores GS pEE12.4. Los vectores preparados se transfirieron genéticamente a células 293 FreeStyle usando una fectina 293, y se cultivaron las células mediante un sistema de cultivo libre de suero usando medio de expresión 293 FreeStyle 293 durante una semana, y luego se obtuvieron respectivamente sobrenadantes de cultivo que comprenden las proteínas mutantes de TSLP humana-Flag o las proteínas mutantes de TSLP de mono-Flag. Se purificaron las proteínas mutantes de TSLP-Flag respectivas usando un gel de afinidad de anticuerpos anti-FLAG M2 (Sigma, Inc.) de los sobrenadantes de cultivo obtenidos.

(Ejemplo 3: Preparación de anti-receptor de TSLP humana totalmente humano)

Se inmunizó un ratón con tecnología de desarrollo de anticuerpo monoclonal humano "VelocImmune" (tecnología de anticuerpo VelocImmune: Regeneron, Inc. (patente estadounidense n.º 6596541) mediante un adyuvante para provocar una reacción inmunitaria, receptor de TSLP humana-Fc (R&D, Inc.), y células Ba/F3 que expresan receptor de TSLP humana (preparado mediante vectores de transferencia que codifican para los genes del receptor de TSLP humana (SEQ ID NO: 10) y genes de cadena α del receptor de IL-7 humana (SEQ ID NO: 11) a células de ratón Ba/F3 (RIKEN: RCB0805)). Según el método convencional, se extrajo un bazo o un ganglio linfático del ratón inmunizado, se recogieron los linfocitos, y las células se fusionaron con células de mieloma de ratón SP2/0 (ATCC CRL-1581), preparando de ese modo hibridoma. Se monoclonó el hibridoma, y luego se cultivó en un medio de cultivo de hibridoma CD (Life technologies, Inc.) que es medio libre de suero. Se purificó el anticuerpo usando un kit de purificación de anticuerpo, kit de purificación de proteína G (Proteus, Inc.) de los sobrenadantes de cultivo obtenidos.

Para la evaluación de la actividad de unión del anticuerpo, se realizó respectivamente ELISA que usa la proteína de fusión Fc humana-receptor de TSLP humana y la proteína de fusión Fc humana-receptor de TSLP de mono preparada en el ejemplo 1. Además, para la evaluación de la actividad neutralizante del anticuerpo, se realizó un ensayo de inhibición del crecimiento celular de células Ba/F3 que expresan el receptor de TSLP humana mediante estimulación de las proteínas mutantes de TSLP de mono-Flag preparadas en el ejemplo 2 y un ensayo de inhibición de producción de la proteína MDC en sangre completa de mono mediante estimulación de las proteínas mutantes de TSLP de mono-Flag preparadas en el ejemplo 2.

A partir de las pruebas descritas anteriormente, se reveló que el anticuerpo (anticuerpo quimérico) denominado T7-27 tuvo actividad de unión y actividad neutralizante con respecto a receptores de TSLP humana y de mono. Se clonaron genes que codifican para la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo a partir de hibridoma que produce T7-27 y se realizó una determinación de secuencia.

En el anticuerpo descrito anteriormente, la región variable deriva de humano y la región constante deriva de ratón. Por este motivo, los vectores de expresión que comprenden tanto genes de la cadena pesada como de la cadena ligera se construyeron usando vectores GS y se preparó un anticuerpo totalmente humano. Específicamente, se conectaron genes que codifican las secuencias de señal (Nigel Whittle *et al.*, Protein Engineering 1987; 1(6): 499 a 505.) al lado 5' de genes de la región variable de cadena pesada del anticuerpo de T7-27 y se conectaron genes de la región constante (que consiste en la secuencia de base de números de base 355 a 1344 de SEQ ID NO: 2) de Ig γ 1 humana al lado 3' de la misma, y luego se insertaron los genes de la cadena pesada genes en vector GS pEE6.4. Además, se conectaron genes que codifican las secuencias de señal (Nigel Whittle *et al.*, mencionado anteriormente) al lado 5' de genes de la región variable de cadena ligera del anticuerpo y se conectaron genes de la región constante (que consiste en la secuencia de base de números de base 325 a 642 de SEQ ID NO: 4) de Ig κ humana al lado 3' de la misma, y luego se insertaron los genes de la cadena ligera en vector GS pEE12.4.

La secuencia de base que codifica para la cadena pesada del anticuerpo totalmente humano del T7-27 preparado (T7-27 totalmente humano) se muestra mediante SEQ ID NO: 2, la secuencia de aminoácidos codificada por aquella se muestra mediante SEQ ID NO: 1, y la secuencia de base que codifica para la cadena ligera del anticuerpo se muestra mediante SEQ ID NO: 4, y la secuencia de aminoácidos codificada por aquella se muestra mediante SEQ ID NO: 3. La región variable de cadena pesada del T7-27 totalmente humano consiste en la secuencia de

aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 118 de SEQ ID NO: 1, y CDR1, CDR2 y CDR 3 de la cadena pesada respectivamente consisten en la secuencia de aminoácidos de números de aminoácido 31 a 35, 50 a 66, y 99 a 107 de SEQ ID NO: 1. La región variable de cadena ligera del T7-27 totalmente humano consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 108 de SEQ ID NO: 3, y CDR1, CDR2 y CDR 3 de la cadena ligera respectivamente consisten en la secuencia de aminoácidos de números de aminoácido 24 a 34, 50 a 56, y 89 a 97 de SEQ ID NO: 3.

El anticuerpo se expresó usando dos tipos de métodos de expresión transitoria y expresión constitutiva con los vectores GS descritos anteriormente en los que se insertaron respectivamente genes de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo. Con respecto a la expresión transitoria, los vectores de expresión de tanto la cadena pesada como la cadena ligera se transfectaron usando la fectina 293 con respecto a células 293 FreeStyle cultivadas en aproximadamente 1.000.000 de células/ml en un medio de expresión 293 FreeStyle, y luego se cultivaron durante 7 días. Alternativamente, los vectores de expresión de tanto de la cadena pesada como la cadena ligera descritos anteriormente se transfectaron usando un método de electroporación con respecto a aproximadamente 10.000.000 de células CHO-K1SV (Lonza, Inc.), y luego se cultivaron en un medio CD-CHO (Life technologies, Inc.) durante 7 días. Los sobrenadantes de cultivo se purificaron usando columna de proteína A o columna de proteína G (GE Healthcare Japan Corporation) y se obtuvo un anticuerpo purificado del anticuerpo totalmente humano. Con respecto a la expresión constitutiva, los vectores GS en los que se insertaron respectivamente genes de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo se cortaron con una enzima de restricción mediante NotI y PvuI, y se realizó ligación usando un kit, kit Ligation-Convenience para ligación (NIPPONGENE, Inc.) o un reactivo de ligación Ligation-high (TOYOBO, Inc.), y entonces se construyeron los vectores GS en los que se insertaron ambos genes de la cadena pesada y la cadena ligera. Los vectores de expresión codificaron la longitud completa de la cadena pesada y la cadena ligera, y el anticuerpo se expresó mediante transfección en células CHO-K1SV. Los sobrenadantes de cultivo se purificaron con columna de proteína A o columna de proteína G (GE Healthcare Japan Corporation) y se obtuvo un anticuerpo purificado del anticuerpo totalmente humano. Como resultado de analizar la modificación de aminoácido del T7-27 purificado totalmente humano, se produjo delección de lisina del extremo C-terminal de la cadena pesada en una gran parte del anticuerpo purificado.

(Ejemplo 4: Evaluación sobre la actividad de unión mediante análisis de SPR)

Para medir la actividad de unión del T7-27 totalmente humano en detalle, se realizó un análisis de SPR. En el presente ejemplo, se usó un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana TSLPR-012_141 (documento de patente 4) como anticuerpo comparativo.

En el análisis de SPR, se realizó el análisis usando Biacore (marca registrada) 2000 (GE Healthcare Japan Corporation). Se inmovilizaron respectivos anticuerpos anti-receptor de TSLP humana sobre la superficie de un chip sensor CM5 usando un kit de captura de anticuerpo humano y un kit de acoplamiento de amina (GE Healthcare Japan Corporation). La proteína de fusión Fc de ratón-TSLP humana obtenida en el ejemplo 1 se diluyó en serie con una disolución de HBS-EP (GE Healthcare Japan Corporation), y se añadieron 100 μ l de la disolución a trayectoria de flujo a una velocidad de flujo de 50 μ l/min. Mediante este sistema de medición, se calcularon la constante de velocidad de unión (k_a), constante de velocidad de disociación (k_d) y constante de disociación (K_D) de la proteína de fusión Fc de ratón-receptor de TSLP humana y el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana usando software de análisis de datos (BIA Evaluation) (tabla 1).

Tabla 1: Actividad de unión con respecto a receptor de TSLP humana mediante análisis de SPR

[Tabla 1]

	KD (M)	Kd (1/s)
T7-27 totalmente humano	$0,41 \times 10^{-8}$	$1,25 \times 10^{-4}$
TSLPR-012_141	$1,26 \times 10^{-8}$	$3,38 \times 10^{-4}$

Como resultado, fue evidente que el T7-27 totalmente humano tuvo una actividad de unión aproximadamente 3 veces más fuerte en comparación con TSLPR-012_141.

(Ejemplo 5: Evaluación de inhibición de la expresión de ARNm de TARC inducida por TSLP usando PBMC humanas)

Para la evaluación de la actividad neutralizante del T7-27 totalmente humano, se evaluó la inhibición de la expresión de ARNm de TARC inducida por TSLP en las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC). Puesto que las PBMC humanas incluyen células dendríticas que expresan el receptor de TSLP, las PBMC humanas pueden usarse para la evaluación del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana. Como anticuerpo comparativo, se usó TSLPR-012_141. A partir del resultado del ejemplo de prueba 1 descrito a continuación, puesto que se encontró una correlación entre mejora de la patología de un modelo de asma e inhibición de la expresión de ARNm de TARC en

sangre usando el anticuerpo anti-receptor de TSLP, el presente sistema de evaluación es un sistema de evaluación que indica efectividad en la patología.

Se sembraron 200.000 células de PBMC humanas (AllCells, Inc.) por pocillo en placas de 96 pocillos (Greiner, Inc.) a 160 μ l de un medio de cultivo RPMI1640 (Life technologies, Inc.). Se preparó una serie de dilución (7 etapas de la concentración final en el intervalo de 0,1 ng/ml a 100 ng/ml) de las proteínas mutantes de TSLP humana-Flag preparadas en el ejemplo 2 en el medio de cultivo RPMI164 y se añadieron 20 μ l de la misma a la disolución de cultivo, seguido por incubación durante 24 horas en un incubador de CO₂ cuya temperatura se estableció a 37°C. Entonces, se prepararon respectivos anticuerpos anti-receptor de TSLP humana en el medio RPMI1640 de modo que la concentración final se volvió de 0,3 μ g/ml, y se añadieron a la disolución de cultivo en una cantidad de 20 μ l, y se incubaron adicionalmente durante 72 horas. Como muestra de control, se prepararon respectivamente un pocillo al que se añadió el medio de cultivo RPMI1640 en lugar de las proteínas mutantes de TSLP humana-Flag y un pocillo al que se añadió el medio de cultivo RPMI1640 en lugar del anticuerpo. Se retiraron 200 μ l de sobrenadantes de cultivo, y entonces se extrajo ARN total con 30 μ l de agua usando un kit, kit RNeasy 96 (Qiagen, Inc.) para purificación de ARN. Por consiguiente, se sometieron 10 μ l de ARN a una reacción de transcripción de fase inversa usando un kit para transcripción inversa, kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Life technologies, Inc.). A continuación, se midió el nivel de expresión de ARNm de TARC mediante un método de PCR TaqMan usando una sonda TaqMan de TARC (Ccl17, Hs00171074, Life technologies, Inc), una sonda TaqMan de β actina (Actb, Hs99999903, Life technologies, Inc.), Express qPCR SuperMix (A10313, Life technologies, Inc.) y 2 μ l de ADNc. Se duplicó la prueba para los respectivos anticuerpos, y se analizó el resultado de la medición usando un método CT de comparación, y entonces se calculó el nivel de expresión de ARNm de TARC. Por consiguiente, se calculó una tasa de inhibición del anticuerpo en cada concentración de TSLP. La tasa de inhibición de un pocillo al que se añadió el medio de cultivo RPMI1640 en lugar de las proteínas mutantes de TSLP humana-Flag se estableció al 100% y se estableció el valor promedio de un pocillo al que se añadieron respectivamente 30 ng/ml y 100 ng/ml de las proteínas mutantes de TSLP humana-Flag como tasa de inhibición del 0%. Se analizó la tasa de inhibición calculada, y se calculó la concentración de TSLP que tiene el 50% de la tasa de inhibición de un anticuerpo 0,3 μ g/ml (tabla 2) ajustando una curva logística de tres parámetros. A medida que esta concentración de TSLP se vuelve mayor, la actividad neutralizante con respecto a TSLP del anticuerpo de prueba se vuelve más fuerte.

Tabla 2: actividad de inhibición de la expresión de ARNm de TARC inducida por TSLP usando PBMC humanas

[Tabla 2]

	Concentración de TSLP (ng/ml)
T7-27 totalmente humano	1,25
TSLPR-012_141	0,08

Como resultado, es evidente que el T7-27 totalmente humano tuvo una actividad de inhibición aproximadamente 12 veces mayor contra la expresión humana de ARNm de TARC inducida por TSLP en comparación con el TSLPR-012_141.

(Ejemplo 6: Evaluación de la inhibición de la producción de proteínas MDC inducida por TSLP usando PBMC humanas)

Se evaluó la inhibición de la producción de proteínas MDC inducida por TSLP en las PBMC humanas para la evaluación de la actividad neutralizante del T7-27 totalmente humano. Como anticuerpo comparativo, se usó TSLPR-012_141.

Se diluyó sangre humana en la misma cantidad de PBS, y se laminó sobre la misma cantidad de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Japan Corporation), y luego se sometió a un tratamiento de centrifuga en las condiciones de temperatura ambiente, 400 x g, y durante 30 minutos, preparando de ese modo las PBMC humanas. Aproximadamente se sembraron 300.000 células de PBMC humanas por pocillo en placas de 96 pocillos (Greiner, Inc.) a 100 μ l de un medio de cultivo RPMI1640 (Life technologies, Inc.). Se preparó la proteína mutante de TSLP humana-Flag preparada en el ejemplo 2 en el medio de cultivo RPMI1640 de modo que la concentración final de la misma se volvió de 5 ng/ml, y se añadió a la disolución de cultivo en una cantidad de 10 μ l de la misma, seguido por incubación durante 24 horas en un incubador de CO₂ cuya temperatura se estableció a 37°C. Entonces, se preparó una serie de dilución (5 etapas de la concentración final en el intervalo de 0,1 ng/ml a 10 μ g/ml) del respectivo anticuerpo anti-receptor de TSLP humana en el medio de cultivo RPMI164 y se añadieron 10 μ l del mismo a la disolución de cultivo, seguido por incubación durante 5 días. Como muestra de control, se prepararon respectivamente un pocillo al que se añadió el medio de cultivo RPMI1640 en lugar de las proteínas mutantes de TSLP humana-Flag y un pocillo al que se añadió el medio de cultivo RPMI1640 en lugar de los anticuerpos. Por consiguiente, se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se evaluó la cantidad de producción de MDC usando un

kit de ELISA para CCL22/MDC humana Quantikine (R&D, Inc.) con sobrenadantes diluidos 20 veces mediante PBS (Life technologies, Inc.). Se duplicó la prueba para los respectivos anticuerpos, y se calculó la tasa de inhibición en cada concentración de anticuerpo. La tasa de inhibición de un pocillo al que se añadió el medio de cultivo RPMI1640 en lugar de las proteínas mutantes de TSLP humana-Flag se estableció al 100% y la tasa de inhibición de un pocillo al que se añadió el medio de cultivo RPMI1640 en lugar del anticuerpo se estableció al 0%. La concentración de anticuerpo que tiene el 50% de la tasa de inhibición se calculó como CI_{50} (tabla 3) ajustando una curva logística de tres parámetros.

Tabla 3: Evaluación de inhibición de la producción de proteínas MDC inducida por TSLP usando PBMC humanas

[Tabla 3]

	CI_{50} (ng/ml)
T7-27 totalmente humano	0,12
TSLPR-012_141	1,10

Como resultado, es evidente que el T7-27 totalmente humano tuvo una actividad de inhibición de aproximadamente 9 veces mayor contra la producción de proteínas MDC inducida por TSLP en comparación con el TSLPR-012_141.

(Ejemplo 7: Evaluación de T7-27 totalmente humano en modelo de sensibilización de mono con antígeno de *Ascaris*)

Se induce IgE específica de antígeno de *Ascaris* permitiendo que se sensibilice un mono con antígeno de *Ascaris*, y se produce una reacción cutánea como reacción alérgica.

Se administró un líquido de antígeno de *Ascaris* (DNP-*Ascaris* (LSL, Inc.)) suspendido en gel de peróxido de aluminio (a continuación en el presente documento, denominado alumbre) (DNP-*Ascaris* 0,5 mg/ml suspendido en PBS a una concentración de alumbre 50 mg/ml, a continuación en el presente documento, denominado líquido de antígeno de *Ascaris*-alumbre) en el día 1, día 8 y día 15 a un macaco cangrejero macho en una cantidad de 3,6 ml/kg por vía intraperitoneal y una cantidad de 0,4 ml/kg por vía intramuscular para la sensibilización. Además, como para los grupos tratados, se establecieron respectivamente un grupo normal (grupo no tratado, n=2), un grupo de vehículo (un grupo al que se administró un disolvente (disolución de tampón de citrato de sodio 20 mM/NaCl 120 mM (pH 6,0)) por vía intravenosa un día antes de la sensibilización, n=3) y un grupo de administración de anticuerpo (un grupo al que se administraron 10 mg/kg de T7-27 totalmente humano (dilución mediante un disolvente) por vía intravenosa un día antes de la sensibilización, n=3).

Además, se preparó alumbre mediante el siguiente método.

Se disolvió sulfato de aluminio (de 14 a 18 hidratos) (Wako, Inc.) en agua ultrapura para preparar disolución 1 M, y se filtró la disolución mediante un filtro de 0,22 μ m, y luego se añadió hidróxido de sodio 1 M (Nacalai Tesque) a lo mismo hasta que no se generó precipitado blanco. Se retiraron los sobrenadantes, se lavaron con agua ultrapura 5 veces, y luego se lavaron adicionalmente mediante PBS (WAKO, Inc.) tres veces. El precipitado blanco lavado se machacó finamente mediante un homogeneizador (CH-6010, KINEMATICA, Inc.) con hielo, seguido por centrifugación a 2000 rpm a una temperatura de 4°C durante 5 minutos usando una centrífuga (himac CR21, Hitachi, Ltd.). Entonces, se retiraron los sobrenadantes, y se lavaron con PBS dos veces. Se suspendió el precipitado obtenido en PBS para obtener alumbre.

Medición de IgE específica de antígeno de *Ascaris* en plasma

Se recogió continuamente sangre del macaco cangrejero descrito anteriormente en el día 1 (antes de la administración de un líquido de antígeno de *Ascaris*-alumbre), día 8, día 15 y día 22, y se recogió plasma tras la centrifugación (1800 x g, 4°C, 10 minutos). Se midió la concentración de la IgE específica de antígeno de *Ascaris* en plasma usando el siguiente método.

Se preparó DNP-*Ascaris* mediante PBS de modo que la concentración del mismo se volvió de 100 μ g/ml, y se añadió a una placa sólida de 96 pocillos Nunc-Immuno™ MicroWell™ (Nunc Inc.) en una cantidad de 100 μ l, y luego se inmovilizó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió un agente de bloqueo (Blocking One: Nacalai Tesque) a lo mismo en una cantidad de 200 μ l, y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos, y se retiró la disolución. Por consiguiente, se añadieron el plasma recuperado y una muestra para una curva de calibración respectivamente en una cantidad de 100 μ l. Como muestra de una curva de calibración, se estableció la concentración de IgE específica de antígeno de *Ascaris* en plasma de uno del grupo de vehículo en el día 22 a 2000 U/ml y se preparó una serie de dilución (de 2000 U/ml a 16 U/ml) mediante una disolución de dilución (Blocking One al 5% que contiene PBS) y se usó. Se realizó incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido por lavado cinco veces en T-PBS (Tween-20 al 0,05% que contiene PBS), y luego se añadió un anticuerpo de detección IgE humano marcado con HRP (A80-108P: Bethyl, Inc.) diluido 10000 veces en una disolución de dilución a lo

mismo en una cantidad de 100 µl. Además, se realizó incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido por lavado 5 veces en T-PBS. Finalmente, se llevó a cabo la medición usando un kit de desarrollo del color de peroxidasa (ML-1120T: SUMILON, Inc.). Se midió la absorbancia usando SpectraMax (Molecular Devices, Inc.). Los resultados del día 1 y día 22 se muestran en la figura 1.

Prueba cutánea

El día 22, se administraron por vía intradérmica PBS, disolución de antígeno de *Ascaris* 1, 10 y 100 µg/ml (una disolución en la que se suspende DNP-*Ascaris* mediante PBS) en dos sitios respectivamente (en total 8 sitios por animal) sobre el abdomen rasurado del mismo individuo del grupo de vehículo y el grupo de administración de anticuerpo en una cantidad de 100 µl. Con respecto al grupo normal, se administraron PBS y disolución de antígeno de *Ascaris* 100 µg/ml por vía intradérmica en 4 sitios respectivamente (en total 8 sitios por animal) sobre el abdomen rasurado del mismo individuo en la cantidad de 100 µl. Tras 20 minutos de la sensibilización cutánea, se observó la reacción cutánea midiendo el diámetro usando un calibre de nonio. En cada individuo, se estableció un valor en el que un diámetro de la reacción cutánea mediante administración de PBS se restó de un diámetro de la reacción cutánea mediante la administración de disolución de antígeno de *Ascaris* a delta cm. Los resultados de la disolución de antígeno de *Ascaris* 100 µg/ml se muestran en la figura 2. Además, en el caso en el que se administró disolución de antígeno de *Ascaris* 1 y 10 µg/ml, no se generó una reacción cutánea suficiente para evaluar el anticuerpo de prueba.

Se adquirieron el valor promedio y el error estándar de cada grupo, y se adquirió una tasa de inhibición estableciendo el valor en el día 1 (valor antes de la administración de líquido de antígeno de *Ascaris*-alumbre) al 100% y el grupo de vehículo en el día 22 al 0% en la medición de la IgE específica de antígeno de *Ascaris* en plasma.

Tal como se muestra en la figura 1, el T7-27 totalmente humano redujo (el 97% de inhibición) la concentración de IgE específica de antígeno de *Ascaris* en el modelo de sensibilización de mono con antígeno de *Ascaris* en comparación con el grupo de vehículo.

Tal como se muestra en la figura 2, el T7-27 totalmente humano redujo la reacción cutánea específica de antígeno de *Ascaris* en una disolución de antígeno de *Ascaris* 100 µg/ml en el modelo de sensibilización de mono con antígeno de *Ascaris* en comparación con el grupo de vehículo.

A partir de los resultados descritos anteriormente, es evidente que el T7-27 totalmente humano suprimió la reacción alérgica provocada por la IgE específica de antígeno de *Ascaris* en el modelo de sensibilización de mono con antígeno de *Ascaris*.

(Ejemplo de prueba 1: Evaluación de anticuerpo anti-receptor de TSLP en modelo de asma de sensibilización de ratón con antígeno de ácaro)

El modelo de sensibilización de ratón con antígeno de ácaro se conoce como modelo de asma y los estados patológicos incluyen aumento en la reactividad de las vías aéreas e infiltración de eosinófilos al lavado broncoalveolar.

Se realizó la sensibilización administrando antígeno de ácaro (Dp) (LSL, Inc.) por vía intraperitoneal a un ratón NC/Nga (Charles River, Inc.) con una dosificación de 100 µg de Dp/0,5 ml de solución salina fisiológica/ratón en el día 0 (en el momento de la sensibilización inicial) y día 5. La inflamación de las vías respiratorias se produjo por la administración nasal del antígeno de ácaro con una dosificación de 100 µg de Dp/50 µl de solución salina fisiológica/ratón en el día 12 y día 19. Se administró un anticuerpo anti-receptor de TSLP de ratón (WAKO, Inc.) disuelto en PBS (WAKO, Inc.) al grupo de administración de anticuerpo por vía subcutánea con una dosificación (0,1,1,10 mg/kg) en el día -1, día 2, día 5, día 8, día 11, día 14 y día 18 (día de administración de anticuerpo) una vez al día. Se proporcionó un grupo de administración de dexametasona (grupo Dex) como grupo de control positivo. Se administró la dexametasona disuelta en PBS al grupo Dex por vía intraperitoneal con una dosificación de 3 mg/kg desde el día 12 hasta el día 19 una vez al día. Los grupos tratados establecidos fueron tal como sigue.

[Grupos tratados]

Grupo normal (n = 10):

Grupo no tratado con solución salina (n = 6):

Se administró el antígeno de ácaro por vía intraperitoneal en el día 0 y día 5, se administró solución salina fisiológica por vía nasal en el día 12 y día 19, y se administró PBS por vía subcutánea en el día de administración de anticuerpo.

Grupo de PBS (n = 10):

Se administró el antígeno de ácaro por vía intraperitoneal en el día 0 y día 5, se administró el antígeno de ácaro por vía nasal en el día 12 y día 19, y se administró PBS por vía subcutánea en el día de administración de anticuerpo.

Grupo de administración de anticuerpo (0,1, 1, 10 mg/kg) (n = 10 para cada dosificación):

Se administró el antígeno de ácaro por vía intraperitoneal en el día 0 y día 5, se administró el antígeno de ácaro por vía nasal en el día 12 y día 19, y se administró el anticuerpo por vía subcutánea en el día de administración de anticuerpo.

Grupo Dex (n = 10):

Se administró el antígeno de ácaro por vía intraperitoneal en el día 0 y día 5, se administró el antígeno de ácaro por vía nasal en el día 12 y día 19, y se administró dexametasona por vía intraperitoneal desde el día 12 hasta el día 19.

Se colocó un ratón en una cámara sin restricciones exclusiva para ratones en el día 20. Se unió un transductor que usa un neumotacógrafo a la cámara, y se conectó a un analizador de la función respiratoria BioSystem XA (Buxco, Inc.), y se detectó un cambio de la presión en el interior de la cámara con respecto a la presión atmosférica usando el transductor. Se aumentó secuencialmente la concentración de cloruro de acetil-β-metilcolina (Sigma, Inc.) (0,25, 0,5, 1, 2, 4 mg/ml) disuelta en solución salina fisiológica y luego se sometió a exposición a inhalación usando un nebulizador ultrasónico para examinar la reactividad de las vías respiratorias. Se usó PenH calculado mecánicamente a partir del cambio de la presión en el interior de la cámara como índice de la función respiratoria. Los resultados de la medición se muestran en la figura 3.

A continuación, después de que se recogiera sangre del ratón de la vena cava del abdomen, se sacrificó el ratón mediante desangrado. Se intubó una cánula en la tráquea, y se lavó el lavado broncoalveolar con suero bovino fetal al 0,1% (BioWest, Inc.) que contiene disolución de PBS, y luego se recogió el líquido del lavado broncoalveolar (BALF). Se centrifugó el BALF, se retiró el sobrenadante, se suspendió el sedimento en 500 µl de solución salina fisiológica, y se preparó una suspensión de células de BALF. Se midió el número de eosinófilos en la suspensión de células de BALF usando un analizador de células sanguíneas automático de múltiples elementos XT-2000i (SYSMEX, Inc.). Los resultados de la medición se muestran en la figura 4.

La sangre obtenida se diluyó 10 veces con medio de cultivo RPMI1640 (Life technologies, Inc.). La sangre diluida se sembró a 1 ml en una placa (IWAKI Co. Ltd.). Se diluyó TSLP de ratón (R&D, Inc.) mediante PBS de modo que la concentración final de la misma se volvió de 0 ó 10 ng/ml, y se añadieron 100 µl de la misma. Se realizó incubación a 37°C durante 24 horas bajo el 5% de CO₂, y se extrajo el ARN total con 30 µl de agua usando un kit RNeasy 96 (Qiagen, Inc.). A continuación, se sometieron 10 µl de ARN a una reacción de transcripción de fase inversa usando un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Life technologies, Inc.). Por consiguiente, se midió el nivel de expresión de ARNm de TARC usando un método de PCR TaqMan usando una sonda TaqMan de TARC (Ccl17, Mn01244826 g1, Life technologies, Inc.), una sonda TaqMan de β-actina (Actb, Mm00607939 s1, Life technologies, Inc.), ExpressqPCR SuperMix (A10313, Life technologies, Inc.) y 2 µl de ADNc. Se calculó el nivel de expresión analizando el resultado de la medición usando un método CT de comparación. Los resultados de TSLP 10 ng/ml se muestran en la figura 5.

Se adquirieron los valores promedio y errores estándar de los respectivos grupos. Se usó la prueba de la t de Student para una prueba de diferencia significativa entre el grupo de PBS y el grupo normal, el grupo con solución salina y el grupo Dex, respectivamente. Para la prueba de diferencia significativa entre el grupo de PBS y el grupo de administración de anticuerpo, se usó comparación múltiple de Dunnett. En ambos casos, estaban presentes diferencias significativas en el caso de p < 0,05.

Tal como se muestra en la figura 3, en el grupo de administración de anticuerpo, se encontró una acción inhibidora sobre la hipersensibilidad de las vías respiratorias inducida por 1 mg/ml de cloruro de acetil-β-metilcolina en el modelo de asma en ratones en comparación con el grupo de PBS. Resultó evidente que el anticuerpo anti-receptor de TSLP mejora la función respiratoria en el modelo de asma.

Tal como se muestra en la figura 4, en el grupo de administración de anticuerpo, se encontró la acción inhibidora sobre la infiltración de eosinófilos al lavado broncoalveolar en comparación con el grupo de PBS.

Tal como se muestra en la figura 5, en el grupo de administración de anticuerpo, se encontró la acción inhibidora sobre la expresión de ARNm de TARC en comparación con el grupo de PBS.

Se confirmó que el anticuerpo anti-receptor de TSLP mejoró el estado patológico del modelo de asma a partir de los resultados de las figuras 3 y 4. Además, se encontró una correlación entre la mejora del estado patológico y la inhibición de la expresión de ARNm de TARC debido al anticuerpo anti-receptor de TSLP a partir de los resultados

de las figuras 3 a 5 y resultó evidente que los efectos de mejora sobre el estado patológico pueden evaluarse usando los efectos inhibidores sobre la expresión del ARNm de TARC como índice.

Aplicabilidad industrial

El anticuerpo anti-receptor de TSLP humana de la presente invención es útil para prevenir y tratar diversas enfermedades en las que la TSLP humana y el receptor de TSLP humana están implicados en patología de enfermedad. Además, los métodos de producción del polinucleótido, los vectores de expresión y la célula huésped de la presente invención son útiles para producir el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana.

[Texto sin la lista de secuencias]

En el encabezado numérico <223> de la lista de secuencias, se hace la descripción de "secuencia artificial". Específicamente, las secuencias de base mostradas por SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 de la lista de secuencias son la secuencia de base de la cadena pesada y la cadena ligera del T7-27 totalmente humano, respectivamente, y las secuencias de aminoácidos mostradas por SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3 son la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y la cadena ligera codificada por la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, respectivamente. Las secuencias de base mostradas SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, y 9 de la lista de secuencias son la secuencia de base que codifica para la proteína de fusión Fc humana-receptor de TSLP humana, la proteína de fusión de Fc de ratón-receptor de TSLP humana, la proteína de fusión Fc humana-receptor de TSLP de mono, la proteína mutante de TSLP humana-Flag y la proteína mutante de TSLP de mono-Flag, respectivamente.

Lista de secuencias

<110> Astellas Pharma Inc.

<120> Anticuerpo anti-receptor de TSLP humana nuevo

<130> A14014A00

<150> Documento JP2013-165676

<151> 09-08-2013

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena H de anticuerpo anti-receptor de TSLP humana

<400> 1

ES 2 730 978 T3

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

ES 2 730 978 T3

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

ES 2 730 978 T3

405

410

415

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

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

<210> 2

<211> 1347

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Gen de cadena H de anticuerpo anti-receptor de TSLP humana

<400> 2

ES 2 730 978 T3

gaggtgcagc tgttggaagt tgggggaggc ttggtacagc cggggggggtc cctgagactc 60
tctgtgcag cctctggatt cacctttcgc agctctgccca tgcattgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gactgaaatg ggtctcaagt gttagtggca gtggtgctgg aacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca atcccaagaa tacactgtat 240
ctgcaaataga acagtctgag agccgaggac acggccgtat attattgtgt gaaagaaggg 300
ggcagccggg gttttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctgagcctcc 360
accaagggcc catcggtctt cccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tctacagtc ctgaggactc 540
tactccctta gtagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagtga gccccaatct 660
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 720
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780
acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgaggg aggagcagta caacagcacg 900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
tccgacggct ctttcttct ctacagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320
agcctctccc tgtctccggg taaatga 1347

<210> 3
5 <211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Cadena L de anticuerpo anti-receptor de TSLP humana

<400> 3

ES 2 730 978 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Leu Tyr Pro Pro
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> 4

5 <211> 645

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Gen de cadena L de anticuerpo anti-receptor de TSLP humana

ES 2 730 978 T3

<400> 4

gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgtc gggcgagtca ggacattagc aattatttag cctggtttca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagtcctt gatctatact gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagatthttg caacttatta ctgccaacag tataatcttt atcctccgac gttcgggcaa	300
gggaccaagg tggaaatcaa acggactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca	360
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat	420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag	480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg	540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc	600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag	645

5

<210> 5

<211> 1395

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> gen de receptor de TSLP humana-Fc humana

<400> 5

15

atgtctgtgc ctacccaggt gctgggactg ctgctgctgt ggctgacaga cgcccgtgt	60
ggagcagcag aaggagtaca gattcagatc atctacttca atttagaaac cgtgcaggtg	120
acatggaatg ccagcaaata ctccaggacc aacctgactt tccactacag attcaacggt	180
gatgaggcct atgaccagtg caccaactac cttctccagg aaggtcacac ttcggggtgc	240
ctcctagacg cagagcagcg agacgacatt ctctatttct ccatcaggaa tgggacgcac	300
cccgttttca ccgcaagtcg ctggatggtt tattacctga aaccagttc cccgaagcac	360
gtgagatthtt cgtggcatca ggatgcagtg acggtgacgt gttctgacct gtcctacggg	420
gatctcctct atgaggttca gtaccggagc cccttcgaca ccgagtggca gtccaaacag	480

ES 2 730 978 T3

gaaaatacct gcaacgtcac catagaaggc ttggatgccg agaagtgtta ctctttctgg 540
gtcagggtga aggctatgga ggatgtatat gggccagaca catacccaag cgactgggtca 600
gaggtgacat gctggcagag aggcgagatt cgggatgcct gtgcagagac accaacgcct 660
cccaaacc aa agctgtccaa aatcgaaggc aggatggacc ccaaattcttg tgacaaaact 720
cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctctctggggg gaccgtcagt ctctctcttc 780
cccccaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtgggtg 840
gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 900
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 960
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1020
tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1080
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 1140
agcctgacct gcctgggtcaa aggtctctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1260
ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 1320
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1380
tctccgggta aatga 1395

<210> 6
<211> 1437
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> gen de receptor de TSLP humana-Fc de ratón
<400> 6

atgtctgtgc ctaccacaggt gctgggactg ctgctgctgt ggctgacaga cgcccgtgt 60
caggcagtgc acgccgcaca tgcagaaatc aacgaaggag cagcagaagg agtacagatt 120
cagatcatct acttcaattt agaaaccgtg caggtgacat ggaatgccag caaatactcc 180
aggaccaacc tgactttcca ctacagattc aacgggtgatg aggcctatga ccagtgcacc 240
aactaccttc tccaggaagg tcacacttcg ggggtgcctcc tagacgcaga gcagcgagac 300
gacattctct atttctccat caggaatggg acgcaccccg ttttcaccgc aagtcgctgg 360
atggtttatt acctgaaacc cagttccccg aagcacgtga gattttcgtg gcatcaggat 420
gcagtgacgg tgacgtgttc tgacctgtcc tacggggatc tcctctatga ggttcagtac 480
cggagccccct tcgacaccga gtggcagtcc aacaggaaa atacctgcaa cgtcaccata 540
gaaggcttgg atgccgagaa gtgttactct ttctgggtca gggatgaaggc tatggaggat 600

ES 2 730 978 T3

```

gtatatgggc cagacacata cccaagcgac tggtcagagg tgacatgctg gcagagagggc 660
gagattcggg atgcctgtgc agagacacca acgcctccca aaccaaagct gtccaaaatc 720
gaaggcagga tggacgagcc tcgaggtcct acaatcaagc cgtgtccacc ttgtaagtgc 780
cccgcgccaa atctgctggg tggtccttct gtattcatat ttccgcccaa gataaaagat 840
gtcttgatga tctctttgtc tccgatcgta acgtgctggg tcgtggatgt gtccgaagat 900
gaccctgacg ttcagatttc atggtttgtc aacaacgtgg aagtgcatac ggctcagact 960
cagacccacc gagaggatta caattccact ctgagagttg tgagcgctct tccgatccag 1020
caccaagatt ggatgagcgg gaaagaattt aagtgcaaag tgaacaataa ggaccttccc 1080
gcgcctatcg aaagaaccat atctaagcca aagggatccg tgcgagctcc acaggtgtac 1140
gtgctgcctc cgccagagga ggaaatgact aagaaacagg tgaccctcac atgcatggta 1200
accgacttca tgcctgaaga tatttacgtg gaatggacca acaacggaaa aaccgaactc 1260
aactacaaaa acacagagcc cgttctggac tccgacggga gctacttcat gtactccaaa 1320
ctgaggggtgg agaaaaagaa ttgggtggaa cgaaatagtt attcatgcag tgtagtccat 1380
gaggggctgc ataatcacca taccacaaag tctttcagca gaaccctgg gaaatga 1437

```

<210> 7

<211> 1395

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> gen de receptor de TSLP de macaco cangrejero-Fc humana

10

<400> 7

ES 2 730 978 T3

```

atgtctgtgc ctaccaggt gctgggactg ctgctgctgt ggctgacaga cgcccgtgt      60
gcaacaggag aaggactaca gattcagatc atctacttta atctagaaac ggtgcagggtg      120
acatggaatg ccagccacta cccagaggat aacctgagtt tccactacaa attcagtcga      180
gatgaggcct atgaccagtg caccgtctac attctccagg aaggtcacac ctcggggtgc      240
ctcctagacg cagagcagca agacgatatt ctgtatttct ccatcaggaa cgggacgcac      300
cccgttttca ccgccagtcg ctggatcttt tattacctga agcccagttc tccgaagcag      360
gtgagctttt cgtggcatca ggacgcggtg acagtgcagt gctctgacct gtcctacagg      420
ggtctcctct atgaggttca gtaccggagc cccttcgaca cggagtggca gtccaaacag      480
gaaaataacct gcaatgtcac tatagaagac ttggatgccg agaagtgtta tgctttccgg      540
gcccgggtga aggccatgga ggatgcgtat gggccggaca cgtacccgag cgactgggtca      600
gaggtgacgt gctggcagag aggcgagact cgcgattcgt gccagagacc tcgcacgcct      660
cccaaaccga agctgtccaa aatcgaaggc aggatggacc ccaaattctg tgacaaaact      720
cacacatgcc caccgtgcc agcacctgaa ctctggggg gaccgtcagt ctctctcttc      780
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggacct ctgaggtcac atgcgtggtg      840
gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag      900
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc      960
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc     1020
tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc     1080
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc     1140
agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc     1200
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacgggtcc     1260
ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc     1320
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg     1380
tctccgggta aatga                                           1395

```

<210> 8
 <211> 483
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> gen de mutante de TSLP humana-Flag
 <400> 8

ES 2 730 978 T3

```

atgtctgtgc ctaccaggt gctgggactg ctgctgctgt ggctgacaga cgcccgctgt      60
tacgacttca ctaactgtga ctttgagaag attaaagcag cctatctcag tactatttct      120
aaagacctga ttacatatat gagtgggacc aaaagtactg agttcaacaa caccgtctct      180
tgtagcaatc ggccacattg ccttactgaa atccagagcc taaccttcaa tcccaccgcc      240
ggctgcgcgt cgctcgccaa agaaatgttc gccatgaaaa ctaaggctgc cttagctatc      300
tggtgcccag gctattcgga aactcagata aatgctactc aggcaatgaa gaagaggaga      360
aaagccaaag tcacaaccaa taaatgtctg gaacaagtgt cacaattaca aggattgtgg      420
cgtcgcttca atcgaccttt actgaaacaa caggactaca aggacgacga tgacaaatga      480
taa                                                                    483

```

<210> 9

<211> 498

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> gen de mutante de TSLP de macaco cangrejero-Flag

<400> 9

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccaccggt      60
tacgacttca ctaactgtga ctttcagaag attgaagcag actatctccg tactatttct      120
aaagacctga ttacatatat gagtgggact aaaagtaccg acttcaacaa caccgtctcc      180
tgtagcaatc ggccacactg ccttactgaa atccagagcc taaccttcaa tcccaccccc      240
cgctgcgcgt cgctcgccaa ggaaatgttc gccaggaaaa ctaaggctac cctcgctctc      300
tggtgcccag gctattcgga aactcagata aatgctactc aggcaatgaa gaagaggaga      360
aaagccaaag tcacaaccaa taaatgtctg gaacaagtgt cacaattact aggattgtgg      420
cgtcgcttca ttcgaacttt actgaaacaa cagcaccacc accaccacca tgactataaa      480
gacgatgacg acaaatga                                                                    498

```

<210> 10

<211> 1116

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

ES 2 730 978 T3

atggggcggc tggttctgct gtggggagct gccgtctttc tgctgggagg ctggatggct	60
ttggggcaag gaggagcagc agaaggagta cagattcaga tcatctactt caatttagaa	120
accgtgcagg tgacatggaa tgccagcaaa tactccagga ccaacctgac tttccactac	180
agattcaacg gtgatgaggc ctatgaccag tgcaccaact accttctcca ggaaggtcac	240
acttcgggggt gcctcctaga cgcagagcag cgagacgaca ttctctattt ctccatcagg	300
aatgggacgc accccgtttt caccgcaagt cgctggatgg tttattacct gaaacctcagt	360
tccccgaagc acgtgagatt ttcgtggcat caggatgcag tgacgggtgac gtgttctgac	420
ctgtcctacg gggatctcct ctatgagggt cagtaccgga gcccttcga caccgagtgg	480
cagtccaaac aggaaaatac ctgcaacgtc accatagaag gcttggatgc cgagaagtgt	540
tactctttct gggtcagggt gaaggctatg gaggatgtat atgggccaga cacataccca	600
agcgactggt cagaggtgac atgctggcag agaggcgaga ttcgggatgc ctgtgcagag	660
acaccaacgc ctcccaaacc aaagctgtcc aaatttattt taatttccag cctggccatc	720
cttctgatgg tgtctctcct cttctgtct ttatggaaat tatggagagt gaggaagttt	780
ctcattccca gcgtgccaga cccgaaatcc atcttccccg ggctctttga gatacaccaa	840
gggaacttcc aggagtggat cacagacacc cagaacgtgg ccacctcca caagatggca	900
ggtgcagagc aagaaagtgg ccccgaggag cccctggtag tccagttggc caagactgaa	960
gccgagtctc ccaggatgct ggaccacag accgaggaga aagaggcctc tgggggatcc	1020
ctccagcttc cccaccagcc cctccaaggt ggtgatgtgg tcacaatcgg gggcttcacc	1080
tttgtgatga atgaccgctc ctacgtggcg ttgtga	1116

<210> 11

<211> 1380

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 11

ES 2 730 978 T3

atgacaattc taggtacaac ttttggcatg gttttttctt tacttcaagt cgtttctgga	60
gaaagtggct atgctcaaaa tggagacttg gaagatgcag aactggatga ctactcattc	120
tcatgctata gccagttgga agtgaatgga tcgcagcact cactgacctg tgcttttgag	180
gacccagatg tcaacatcac caatctggaa tttgaaatat gtggggccct cgtggaggta	240
aagtgcctga atttcaggaa actacaagag atatatttca tcgagacaaa gaaattctta	300
ctgattggaa agagcaatat atgtgtgaag gttggagaaa agagtctaac ctgcaaaaaa	360
atagacctaa ccactatagt taaacctgag gctccttttg acctgagtgt cgtctatcgg	420
gaaggagcca atgactttgt ggtgacattt aatacatcac acttgcaaaa gaagtatgta	480
aaagttttaa tgcacgatgt agcttaccgc caggaaaagg atgaaaacaa atggacgcat	540
gtgaatttat ccagcacaaa gctgacactc ctgcagagaa agctccaacc ggcagcaatg	600
tatgagatta aagttcgatc catccctgat cactatttta aaggcttctg gagtgaatgg	660
agtccaagtt attacttcag aactccagag atcaataata gctcagggga gatggatcct	720
atcttactaa ccatcagcat tttgagtttt ttctctgtcg ctctgttggt catcttggcc	780
tgtgtgttat ggaaaaaaag gattaagcct atcgtatggc ccagtctccc cgatcataag	840
aagactctgg aacatctttg taagaaacca agaaaaatt taaatgtgag tttcaatcct	900
gaaagtttcc tggactgcca gattcatagg gtggatgaca ttcaagctag agatgaagtg	960
gaaggttttc tgcaagatac gtttcctcag caactagaag aatctgagaa gcagaggctt	1020
ggaggggatg tgcagagccc caactgccc tctgaggatg tagtcatcac tccagaaagc	1080
tttggaagag attcatccct cacatgcctg gctgggaatg tcagtgcacg tgacgcccct	1140
attctctcct cttccaggtc cctagactgc agggagagtg gcaagaatgg gcctcatgtg	1200
taccaggacc tcctgcttag ccttgggact acaaacagca cgctgcccc tccattttct	1260
ctccaatctg gaatcctgac attgaaccca gttgctcagg gtcagcccat tcttacttcc	1320
ctgggatcaa atcaagaaga agcatatgtc accatgtcca gcttctacca aaaccagtga	1380

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o fragmento de unión a antígeno del mismo seleccionado de (1) o (2) a continuación:

(1) un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 118 de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 108 de SEQ ID NO: 3;

(2) un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo en el que ácido glutámico del extremo N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo de (1) se modifica a ácido piroglutámico.

2. Anticuerpo anti-receptor de TSLP humana según la reivindicación 1, que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 3.

3. Anticuerpo anti-receptor de TSLP humana según la reivindicación 1, que comprende la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 1, en el que el ácido glutámico del número de aminoácido 1 de SEQ ID NO: 1 se modifica a ácido piroglutámico y/o lisina del número de aminoácido 448 de SEQ ID NO: 1 se deleta, y la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 3.

4. Anticuerpo anti-receptor de TSLP humana según la reivindicación 3, que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de los números de aminoácido 1 a 447 de SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID NO: 3.

5. Polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo según la reivindicación 1(1) y un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo según la reivindicación 1(1).

6. Vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo según la reivindicación 1(1) y un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo según la reivindicación 1(1).

7. Célula huésped seleccionada del grupo que consiste en lo siguiente (a) a (d):

(a) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana según la reivindicación 1(1) y un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo;

(b) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana según la reivindicación 1(1) y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo;

(c) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana según la reivindicación 1(1); y

(d) una célula huésped transformada con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de base que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-receptor de TSLP humana según la reivindicación 1(1),

en el que la célula huésped expresa dicho anticuerpo.

8. Anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o fragmento de unión a antígeno del mismo producido mediante un método que comprende cultivar una célula huésped para que exprese un anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que la célula huésped es la célula huésped según la reivindicación 7.

9. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de

unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1(1) y/o el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana o el fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1(2), y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, que comprende el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana según la reivindicación 2 y/o el anticuerpo anti-receptor de TSLP humana según la reivindicación 4, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, que es la composición farmacéutica para prevenir o tratar asma.

Fig. 1

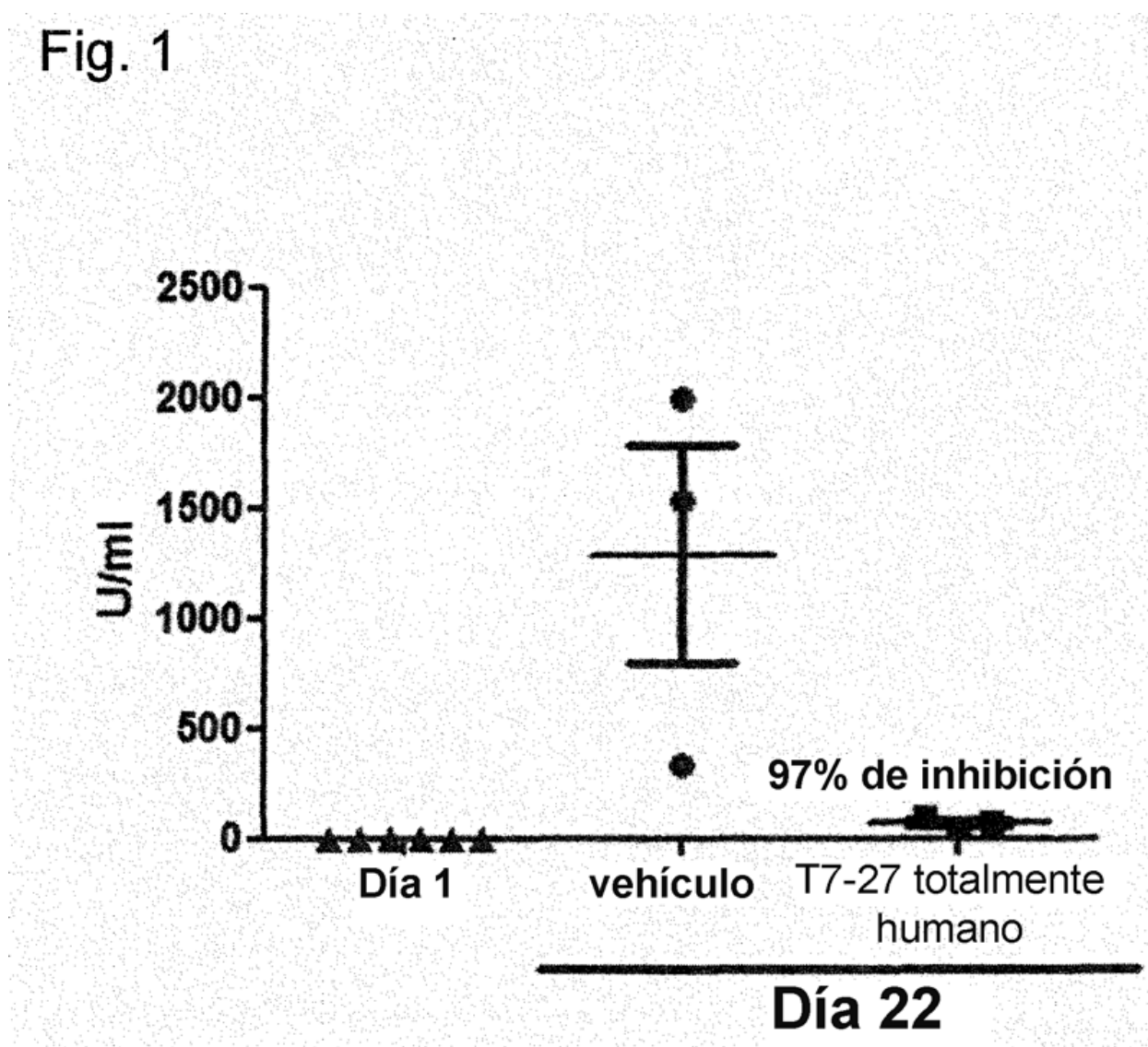


Fig. 2

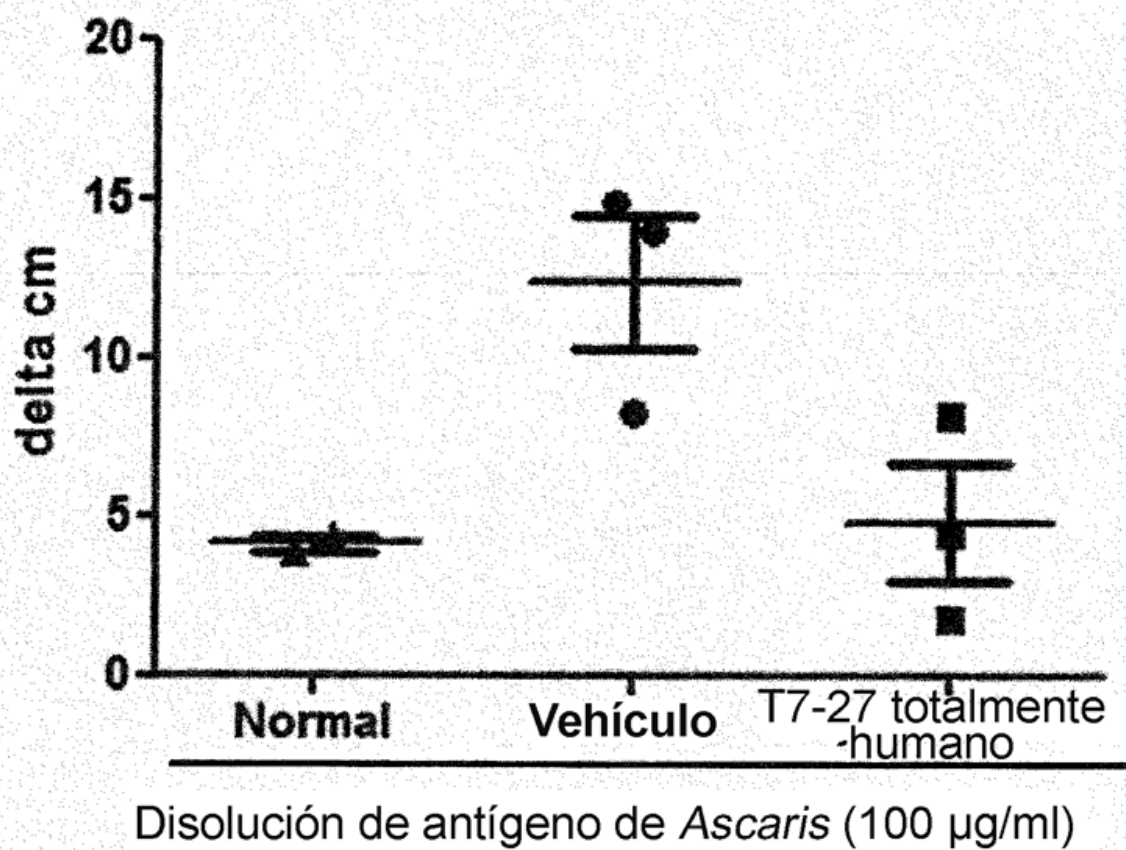


Fig. 3

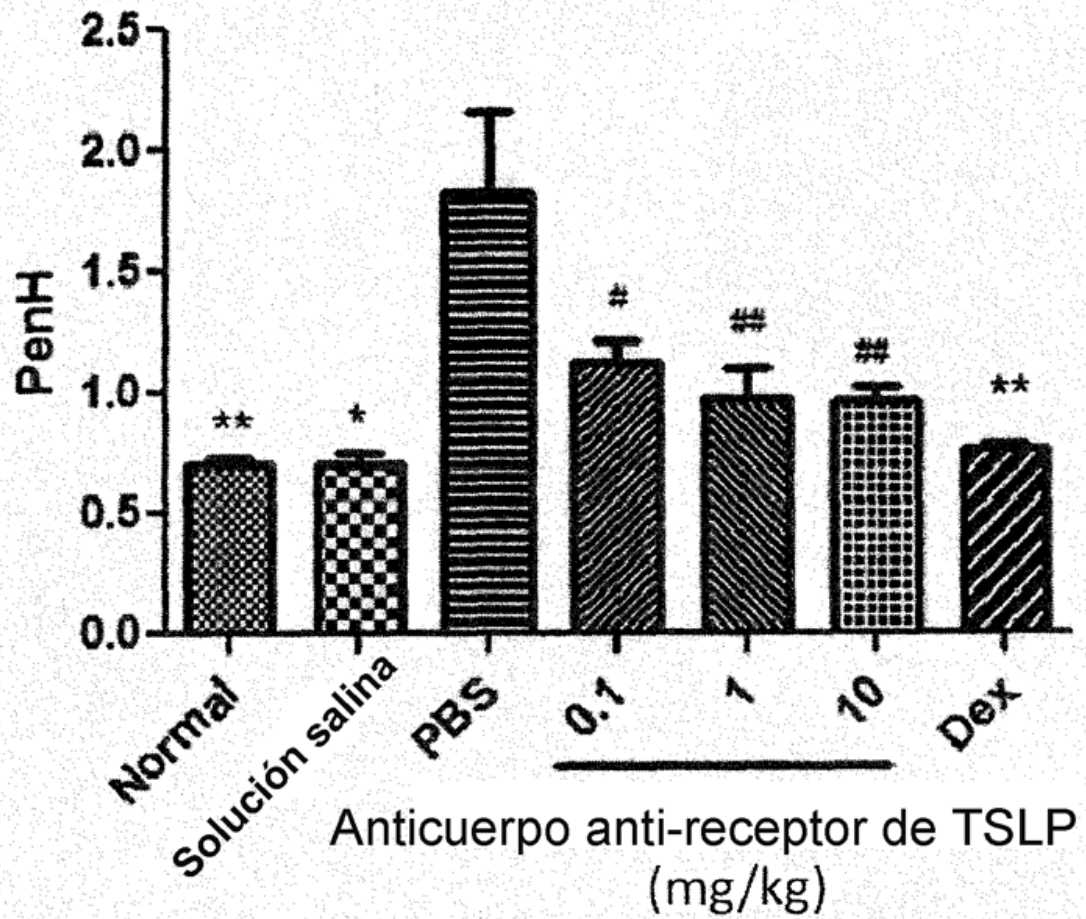


Fig. 4

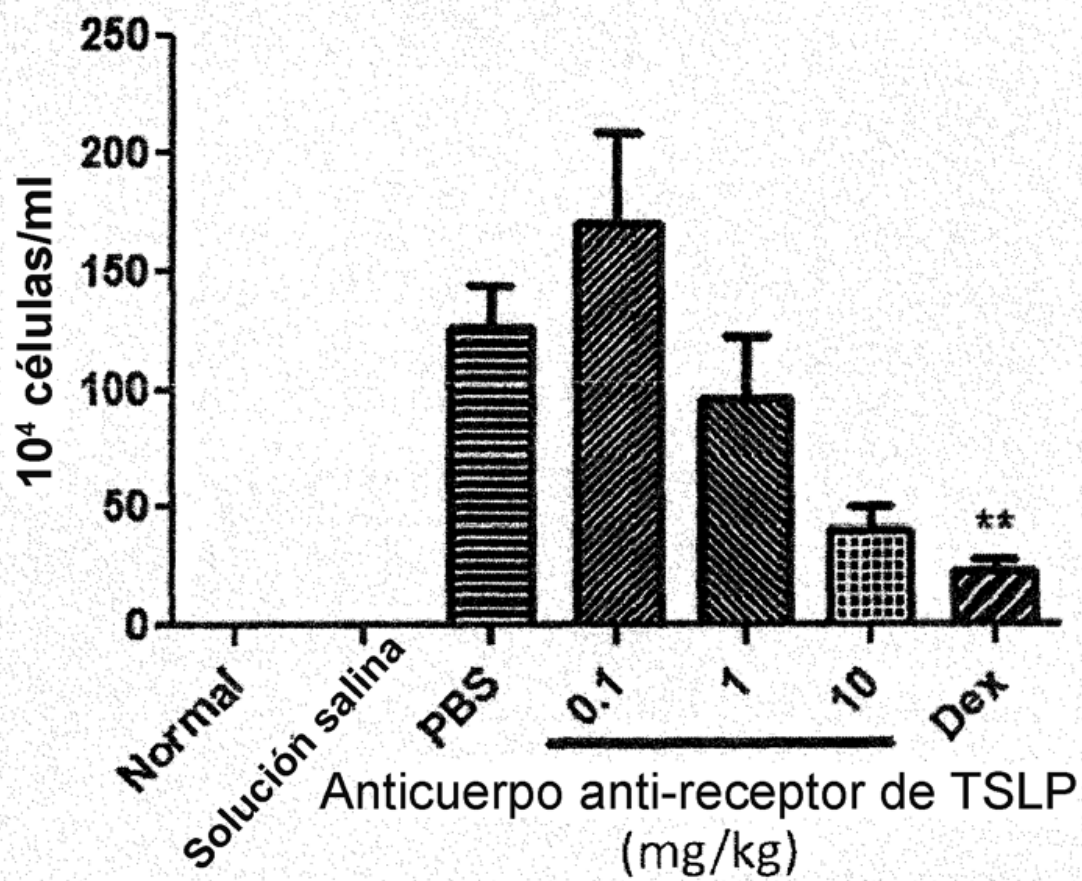


Fig. 5

