

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491321 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.09.20(22) Дата подачи заявки
2022.11.18(51) Int. Cl. C07K 16/24 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 5/07 (2010.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ TSLP, ЕГО АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202111461974.6

(32) 2021.12.02

(33) CN

(86) PCT/CN2022/132848

(87) WO 2023/098491 2023.06.08

(71) Заявитель:

БЕЙДЖИНГ ДУНФАН БАЙОТЕК
КО., ЛТД. (CN)

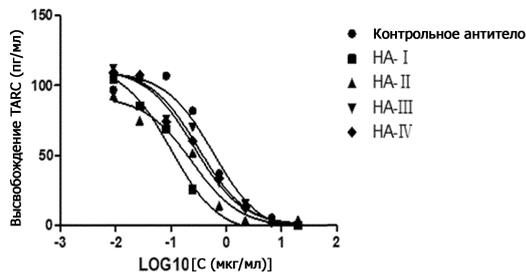
(72) Изобретатель:

Бай И, Пэй Шуан, Лю Сы (CN)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Представлено моноклональное антитело против TSLP, его антигенсвязывающие фрагменты и их применение. Антитело обладает относительно высоким сродством к антигену TSLP, оно может эффективно ингибировать связывание антигена TSLP с его рецепторным комплексом, а затем предотвращать высвобождение провоспалительных цитокинов из иммунной клетки-мишени для TSLP, тем самым предотвращая приступ астмы и улучшая контроль над ней. Молекула моноклонального антитела, полученная при скрининге в настоящем изобретении, также обладает относительно высокой термостабильностью и сравнительно хорошей безопасностью. Настоящее изобретение может применяться для лечения астмы, хронической обструктивной болезни легких, хронической эозинофильной пневмонии, идиопатического фиброза легких и аллергического дерматита; и астма включает тяжелую астму, эозинофильную или неэозинофильную астму и слабоэозинофильную астму.



A1

202491321

202491321

A1

МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ TSLP, ЕГО АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Настоящая заявка претендует на приоритет от китайской патентной заявки № 202111461974.6, поданной 2 декабря 2021 г., которая настоящим включена сюда путем ссылки во всей полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области биомедицины, в частности, оно касается моноклонального антитела против TSLP, его антигенсвязывающих фрагментов и их применения.

Уровень техники

В настоящее время астма является одним из наиболее распространенных хронических заболеваний в мире, уровень заболеваемости астмой составляет около 4,3% и в мире насчитывается около 300 миллионов больных астмой, а распространенность астмы варьируется в разных странах от 1% до 18%, причем 10-20% тяжелых случаев астмы с большим трудом удается контролировать при современных методах лечения, и на этих пациентов приходится 50-60% медицинских расходов, связанных с астмой. Из-за сложных экономических условий в большинстве развивающихся стран, включая Китай, многие пациенты не получают эффективной диагностики и лечения. 21 июня 2019 г. авторитетный международный медицинский журнал “The Lancet” опубликовал еще одно важное достижение крупномасштабного обследования населения “Chinese Adult Pulmonary Health Study” (исследования СРН), проведенного китайскими учеными, которое выявило степень распространенности астмы в Китае и подтвердило, что уровень распространенности астмы среди взрослых в возрасте 20 лет и старше в Китае составляет 4,2%, а число заболевших достигает 45,7 млн. Астма в Китае уже стала одной из главных проблем общественного здравоохранения, с которой нужно серьезно бороться. Китайские рекомендации по профилактике и лечению бронхиальной астмы указывают на то, что более 70% отечественных больных астмой по-прежнему плохо поддаются контролю, число случаев неотложной помощи и госпитализации пациентов достигает 27% и 23%, соответственно, из-за приступов астмы в течение года, а плохой контроль над астмой может серьезно повлиять на качество жизни пациентов.

Астма – это хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в котором участвуют различные воспалительные клетки и медиаторы. Это хроническое воспаление связано с гиперреактивностью дыхательных путей и клинически проявляется

повторяющимися хрипами, одышкой, стеснением в груди и кашлем, которые часто возникают и усиливаются ночью и/или утром, причем у большинства пациентов эти симптомы могут ослабевать либо спонтанно, либо при лечении; а патологически это проявляется в виде хронических воспалительных изменений в дыхательных путях, а также ремоделирования дыхательных путей, которое включает утолщение стенок дыхательных путей, подкожный фиброз вследствие отложения матрикса и коллагена, пролиферацию и гипертрофию гладких мышц, пролиферацию миофибробластов и слизистых желез, метаплазию и пролиферацию бокаловидных клеток, что вызывает большие трудности для лечения. К настоящему времени на мировом рынке имеется множество видов лекарств от астмы, которые по большей части являются химическими препаратами. С непрерывным развитием биофармацевтики все большее внимание людей привлекают исследования и разработки биофармацевтических препаратов от астмы.

Астма, обусловленная воспалением 2 типа (T2) (с высоким уровнем T2), встречается более чем у двух третей больных тяжелой формой астмы, она характеризуется повышенным уровнем биомаркеров воспаления T2. Идентификация диагностических и прогностических биомаркеров (включая эозинофилы крови, IgE в сыворотке, содержание оксида азота в выдыхаемом воздухе (FeNO), периостин и др.) произвела революцию в области целенаправленного лечения тяжелой астмы. Моноклональные антитела, нацеленные на воспаление 2 типа, обычно безопасны для взрослых пациентов с бронхиальной астмой средней и тяжелой степени. Примерно треть больных тяжелой астмой не имеют признаков активированного пути воспаления T2, и симптомы заболеваний, не связанных с T2, у этих пациентов по-прежнему остаются неконтролируемыми при лечении по стандартным клиническим рекомендациям. Результаты исследований астмы не 2-го типа еще не ясны, и необходимы дальнейшие исследования для определения биомаркеров, направляющих целенаправленное лечение различных форм астмы не 2-го типа.

Стромальный лимфопоэтин тимуса (TSLP) – это эпителиальный цитокин, вырабатываемый в ответ на провоспалительные стимулы (как-то аллергены, вирусы и другие патогены в легких), который усиливает пролиферацию клеток тимоцитов. TSLP стимулирует высвобождение нижележащих T2-цитокинов, включая IL-4, IL-5 и IL-13, что вызывает воспаление и симптомы астмы. TSLP также может активировать различные типы клеток, участвующих в воспалении, не связанном с T2. Так, активность TSLP на ранних стадиях каскада воспалительных реакций уже была идентифицирована как потенциальная мишень для широкого круга больных астмой.

Кроме того, TSLP регулирует иммунитет, активируя незрелые дендритные клетки

(DC), лимфоциты, тучные клетки, базофилы и эозинофилы. TSLP запускает внутриклеточную передачу сигналов через комплекс, образованный его специфическим рецептором TSLPR и корецептором IL-7Ra. TSLP сначала связывается с TSLPR с высоким сродством, а затем образует тройной комплекс с внеклеточным доменом IL-7Ra. Две противоположные грани TSLP взаимодействуют с TSLPR и IL-7Ra, соответственно. Необходимым сигналом для реакции T2, опосредованной TSLP, является активация STAT5. Гуманизованные моноклональные антитела против TSLP могут специфически связываться с человеческим TSLP и блокировать его взаимодействие с рецепторным комплексом, что может воспрепятствовать высвобождению провоспалительных цитокинов из иммунных клеток-мишеней TSLP, тем самым предотвращая приступ астмы и улучшая контроль над ней.

В настоящее время компания AstraZeneca и её партнер Amgen разрабатывают тезепелумаб (также известный как AMG157), который является первым препаратом моноклональных антител, нацеленных на TSLP, но он еще не поступал в продажу. Клинические исследования показали, что гуманизованные моноклональные антитела против TSLP воздействуют на ранние стадии каскада воспалительных реакций и подходят для широкого круга больных тяжелой неконтролируемой астмой, включая пациентов с астмой, не связанной с T2. Концептуальное исследование с пробой на вдыхание аллергена, проведенное на пациентах с легкой и атопической астмой, доказало, что они могут подавлять ранние и поздние астматические реакции и снижать уровень воспалительных биомаркеров T2. Учитывая важность нацеленных на TSLP препаратов при лечении астмы, существует настоятельная потребность в разработке препаратов для терапии с моноклональными антителами при индивидуальной или адъювантной терапии астмы, чтобы удовлетворить потребности пациентов с астмой как внутри страны, так и за рубежом.

Сущность изобретения

Для того, чтобы удовлетворить потребности рынка, в настоящем изобретении получили моноклональные антитела против TSLP, их антигенсвязывающие фрагменты и способы их применения, которые могут специфически связываться с TSLP и обладают сравнительно высокой биологической активностью, путем скрининга иммунной библиотеки.

Конкретные технические схемы в настоящем изобретении заключаются в следующем.

Настоящим изобретением предусмотрены моноклональные антитела против TSLP либо их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие переменную область тяжелой

цепи и вариабельную область легкой цепи, причем вариабельная область тяжелой цепи содержит 3 определяющих комплементарность участка тяжелой цепи, представленные HCDR1, HCDR2 и HCDR3, соответственно, вариабельная область легкой цепи содержит 3 определяющих комплементарность участка легкой цепи, представленные LCDR1, LCDR2 и LCDR3, соответственно, а моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты выбирают из числа следующих:

A-I: определяющий комплементарность участок тяжелой цепи HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, определяющий комплементарность участок тяжелой цепи HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, определяющий комплементарность участок тяжелой цепи HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, определяющий комплементарность участок легкой цепи LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, определяющий комплементарность участок легкой цепи LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5, а определяющий комплементарность участок легкой цепи LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6;

A-II: определяющий комплементарность участок тяжелой цепи HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, определяющий комплементарность участок тяжелой цепи HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8, определяющий комплементарность участок тяжелой цепи HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, определяющий комплементарность участок легкой цепи LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, определяющий комплементарность участок легкой цепи LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10, а определяющий комплементарность участок легкой цепи LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6;

A-III: определяющий комплементарность участок тяжелой цепи HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, определяющий комплементарность участок тяжелой цепи HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, определяющий комплементарность участок тяжелой цепи HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, определяющий комплементарность участок легкой цепи LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12,

определяющий комплементарность участок легкой цепи LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, а определяющий комплементарность участок легкой цепи LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14; и

A-IV: определяющий комплементарность участок тяжелой цепи HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, определяющий комплементарность участок тяжелой цепи HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, определяющий комплементарность участок тяжелой цепи HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, определяющий комплементарность участок легкой цепи LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, определяющий комплементарность участок легкой цепи LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15, а определяющий комплементарность участок легкой цепи LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16.

В настоящем изобретении получены вышеуказанные 4 молекулы моноклональных антител путем скрининга иммунной библиотеки, которые могут связываться с антигеном TSLP с высоким сродством и обладают хорошей связывающей активностью, при этом блокируется их взаимодействие с рецепторным комплексом, а затем предотвращается высвобождение провоспалительных цитокинов из иммунных клеток-мишеней TSLP, предотвращается приступ астмы и улучшается контроль над ней. Кроме того, молекулы моноклональных антител, полученные при скрининге по настоящему изобретению, также обладают относительно высокой термостабильностью и соответствуют условиям для фармацевтической разработки.

Далее, моноклональные антитела против TSLP либо их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой молекулы мышинных антител, причем молекулы мышинных антител выбирают из числа следующих:

МА-I: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18;

МА-II: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20;

МА-III: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21, а переменная область легкой цепи

содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22; и

МА-IV: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24;

предпочтительно молекула мышинного антитела – это МА-I.

В настоящем изобретении иммунизируют мышей антигеном TSLP, оптимизируют иммунный метод, создают библиотеку фагового дисплея и выявляют вышеуказанные молекулы мышинных антител с относительно высоким сродством, хорошей активностью и стабильностью. При обширных экспериментах на клеточном уровне установлено, что по сравнению с тремя другими молекулами мышинных антител МА-I обладает более высокой биологической активностью. Поэтому в настоящем изобретении предпочтительно выбрали МА-I.

Далее, молекулы мышинных антител также содержат константную область тяжелой цепи мышинных антител и константную область легкой цепи мышинных антител, причем константную область тяжелой цепи мышинных антител выбирают из константной области мыши типа IgG1, типа IgG2a, типа IgG2b или типа IgG3, при этом аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG1 приведена в SEQ ID NO: 26, аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG2a приведена в SEQ ID NO: 27, аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG2b приведена в SEQ ID NO: 28 и аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG3 приведена в SEQ ID NO: 29; а константная область легкой цепи мышинных антител представляет собой легкую цепь мыши типа C_κ, её аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 25; и

предпочтительно молекулы мышинных антител содержат константную область тяжелой цепи мыши типа IgG1 и константную область легкой цепи мыши типа C_κ.

Далее, моноклональное антитело либо его антигенсвязывающие фрагменты представляют собой молекулы химерных антител, причем молекулы химерных антител содержат переменную область тяжелой цепи молекул мышинных антител, переменную область легкой цепи молекул мышинных антител и константную область гуманизованных антител.

Молекулы химерных антител включают последовательность переменной области молекул мышинных антител и константной области гуманизованных антител, причем конструкция молекул химерных антител используется для проверки того, что гуманизация константной области по настоящему изобретению не изменяет специфических функций участков, определяющих комплементарность (CDR), и служит основой для дальнейших

исследований и разработки молекул гуманизованных антител.

Далее, моноклональные антитела либо их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой молекулы гуманизованных антител, причем молекулы гуманизованных антител выбирают из числа следующих:

HA-I: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35;

HA-II: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36;

HA-III: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38;

HA-IV: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36;

предпочтительно молекула гуманизованного антитела – это HA-I.

В настоящем изобретении проводится гуманизация молекул мышиных антител и получение молекул гуманизованных антител после скрининга. При экспериментальной проверке *in vitro* и *in vivo* установлено, что среди 4-х молекул гуманизованных антител, полученных в настоящем изобретении, HA-I обладает наибольшей биологической активностью и наиболее значительным терапевтическим эффектом. Поэтому в настоящем изобретении предпочтительно выбрали HA-I.

Далее, молекулы гуманизованных антител также включают в себя константную область гуманизованных антител.

Кроме того, молекулы гуманизованных антител представляют собой полноразмерные антитела или фрагменты антител, причем молекулы гуманизованных антител включают один из фрагментов или комбинацию из Fab, F(ab)₂, Fv или scFv.

Далее, константная область гуманизованных антител содержит константную область тяжелой цепи гуманизованных антител и константную область легкой цепи гуманизованных антител, причем константную область тяжелой цепи гуманизованных антител выбирают из константной области тяжелой цепи человека типа IgG1, типа IgG2 или типа IgG4, а аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG1 приведена в SEQ ID NO: 30, аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG2 приведена в SEQ ID NO: 31, аминокислотная

последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG4 приведена в SEQ ID NO: 32, а константная область легкой цепи гуманизованных антител – это константная область легкой цепи человека типа C_κ, её аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 33; и

предпочтительно константная область гуманизованных антител содержит константную область тяжелой цепи человека типа IgG1 и константную область легкой цепи человека типа C_κ.

Настоящим изобретением также предусмотрены белки, которые содержат моноклональные антитела против TSLP либо их антигенсвязывающие фрагменты.

Настоящим изобретением также предусмотрены молекулы полинуклеотидов, которые кодируют моноклональные антитела против TSLP либо их антигенсвязывающие фрагменты.

Настоящим изобретением также предусмотрены векторы для экспрессии рекомбинантной ДНК, которые содержат молекулы полинуклеотидов.

Настоящим изобретением также предусмотрена клетка-хозяин, трансфицированная вектором для экспрессии рекомбинантной ДНК, причем клетка-хозяин включает прокариотическую клетку, дрожжевую клетку, клетку насекомых или клетку млекопитающих; и

предпочтительно клетка-хозяин – это клетка млекопитающих, а клетка млекопитающих – это клетка HEK293, клетка CHO или клетка NS0.

Настоящим изобретением также предусмотрено лекарственное средство, которое содержит моноклональное антитело против TSLP либо его антигенсвязывающий фрагмент.

Настоящим изобретением также предусмотрено применение моноклонального антитела против TSLP либо его антигенсвязывающего фрагмента при получении лекарственного средства для лечения иммунологического заболевания или рака; и

предпочтительно иммунологическое заболевание включает астму, хроническую обструктивную болезнь легких, хроническую эозинофильную пневмонию, идиопатический фиброз легких и аллергический дерматит; причем астма включает тяжелую астму, эозинофильную или неэозинофильную астму и слабоэозинофильную астму; и

предпочтительно рак включает рак поджелудочной железы, мелкоклеточный рак легких, меланому, рак простаты, рак почек, колоректальный рак или рак молочной железы.

Настоящим изобретением также предусмотрен способ лечения или профилактики

заболевания, опосредованного TSLP, который включает введение терапевтически эффективного количества моноклонального антитела против TSLP нуждающемуся в этом лицу, а заболевание включает иммунологическое заболевание или рак;

причем иммунологическое заболевание включает астму, хроническую обструктивную болезнь легких, хроническую эозинофильную пневмонию, идиопатический фиброз легких и аллергический дерматит; причем астма охватывает тяжелую астму, эозинофильную или незозинофильную астму и слабоэозинофильную астму; а

рак включает рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легких, меланому, рак простаты, рак почек, колоректальный рак или же рак молочной железы.

Полезные эффекты настоящего изобретения включают по меньшей мере это: моноклональное антитело против TSLP либо его антигенсвязывающий фрагмент, обеспечиваемое настоящим изобретением, обладает относительно высоким сродством к антигену TSLP и может эффективно блокировать связывание антигена TSLP со своим рецепторным комплексом, при этом предотвращается высвобождение провоспалительных цитокинов из иммунной клетки-мишени TSLP, предотвращается приступ астмы и улучшается контроль над ней. Кроме того, молекулы моноклональных антител, отобранные при скрининге по настоящему изобретению, также обладают относительно высокой термостабильностью и хорошей безопасностью. Моноклональные антитела против TSLP либо их антигенсвязывающие фрагменты, отобранные по настоящему изобретению, могут применяться для лечения иммунологических заболеваний или рака, причем иммунологическое заболевание включает, без ограничения, астму, хроническую обструктивную болезнь легких, хроническую эозинофильную пневмонию, идиопатический фиброз легких и аллергический дерматит; а астма охватывает, без ограничения, эозинофильную или незозинофильную астму и слабоэозинофильную астму; рак включает, без ограничения, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легких, меланому, рак простаты, рак почек, колоректальный рак или рак молочной железы.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлен плазмидный профиль вектора pScFv-Disb-HS из примера 2 настоящего изобретения.

На фиг. 2 представлен сравнительный график относительного сродства по ELISA на серийных разведениях фага с моноклональными антителами против TSLP из примера 3 настоящего изобретения.

На фиг. 3 представлена схема вектора pTSE из примера 5 настоящего изобретения.

На фиг. 4 представлен снимок электрофореза денатурированных молекул мышинных антител в полиакриламидном геле из примера 5 настоящего изобретения.

На фиг. 5 представлен сравнительный график способности к связыванию мышинных антител с TSLP из примера 6 настоящего изобретения.

На фиг. 6 представлен сравнительный график из эксперимента по конкурентному ингибированию между мышинным антителом и белком CRLF2 рецептора TSLP из примера 7 настоящего изобретения.

На фиг. 7 представлен снимок электрофореза денатурированной молекулы гуманизованного антитела в полиакриламидном геле из примера 12 настоящего изобретения.

На фиг. 8 представлен сравнительный график способности к связыванию молекулы гуманизованного антитела с TSLP из примера 15 настоящего изобретения.

На фиг. 9 представлен сравнительный график из эксперимента по конкурентному ингибированию между гуманизованным антителом и контрольным антителом из примера 16 настоящего изобретения.

На фиг. 10 представлен график из эксперимента по перекрестному связыванию между гуманизованным антителом и TSLP из другого вида в примере 17 настоящего изобретения.

На фиг. 11 представлен сравнительный график из эксперимента, в котором моноклональное антитело против TSLP ингибирует связывание TSLP с рецептором клеточной поверхности в примере 18 настоящего изобретения.

На фиг. 12 представлен сравнительный график по определению биологической активности (методом репортерных генов) у моноклонального антитела против TSLP в примере 19 настоящего изобретения.

На фиг. 13 представлен сравнительный график по блокированию моноклональным антителом против TSLP индуцированного TSLP высвобождения хемокина из клеток mDC в примере 20 настоящего изобретения.

На фиг. 14 представлен график по определению термостабильности моноклонального антитела HA-1 против TSLP в примере 21 настоящего изобретения.

Раскрытие сущности изобретения

Для того, чтобы легче понять настоящее изобретение, перед описанием примеров сначала поясним некоторые технические и научные термины настоящего изобретения следующим образом.

Термин “антитело”, используемый в данной статье, включает все антитела и любые антигенсвязывающие фрагменты, причем антитела включают мышинные антитела,

гуманизированные антитела, биспецифичные антитела или химерные антитела, а также это могут быть антитела типа Fab, F(ab)₂, Fv или scFv (одноцепочечные антитела), а также антитела, существующие в природе, или модифицированные антитела (как-то мутации, делеции или замены).

Термины “вариабельная область” и “константная область”, используемые в данной статье, означают, что участки последовательности тяжелой цепи и легкой цепи антител вблизи N-конца составляют вариабельную область (V-область), а остальные аминокислотные последовательности вблизи C-конца относительно стабильны и составляют константную область (C-область). Вариабельная область включает в себя 3 участка, определяющих комплементарность (CDR), и 4 каркасных участка (FR), причем каждая вариабельная область легкой цепи и вариабельная область тяжелой цепи состоит из 3 CDR и 4 FR, 3 CDR тяжелой цепи представлены HCDR1, HCDR2 и HCDR3, соответственно, а 3 CDR легкой цепи представлены LCDR1, LCDR2 и LCDR3, соответственно.

Термин “молекула мышинового антитела”, используемый в данной статье, происходит от антител, полученных при иммунизации мышей антигеном TSLP.

Термин “молекула химерного антитела”, используемый в данной статье, относится к антителу, образуемому при слиянии вариабельной области мышинового антитела с константной областью гуманизированного антитела, что может ослабить иммунный ответ, вызванный мышинным антителом в организме человека. Химерное антитело получает по технологии рекомбинантной ДНК за счет вставки генов вариабельной области легкой и тяжелой цепей мышинных моноклональных антител в экспрессионный вектор, содержащий константную область гуманизированного антитела. Таким образом, вариабельная область легкой и тяжелой цепи в экспрессируемой молекуле антитела будет мышиной, тогда как константная область будет человеческой, и почти две трети всей молекулы антитела будет человеческой. Полученное таким образом антитело снижает иммуногенность мышинового антитела, но сохраняет способность исходного антитела специфически связываться с антигеном.

Термин “молекула гуманизированного антитела”, используемый в данном документе, означает то, что CDR мышинового моноклонального антитела пересаживают в вариабельную область гуманизированного антитела, чтобы заменить CDR у гуманизированного антитела с тем, чтобы гуманизированное антитело приобретало антигенсвязывающую специфичность мышинового моноклонального антитела и при этом уменьшалась гетерогенность.

Термин “клетка CHO” относится к клеткам яичников китайского хомячка, термин

“клетка HEK293” относится к эмбриональным почечным клеткам 293 человека, а термин “клетка NS0” относится к клеткам тимомы NS0 мыши.

Далее настоящее изобретение подробно описано ниже в сочетании с примерами.

Примеры

Пример 1

В примере 1 настоящего изобретения представлено моноклональное антитело против TSLP либо его антигенсвязывающий фрагмент, в частности, включающие переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область тяжелой цепи включает 3 определяющих комплементарность участка тяжелой цепи, представленные HCDR1, HCDR2 и HCDR3, соответственно, а переменная область легкой цепи включает 3 определяющих комплементарность участка легкой цепи, представленные LCDR1, LCDR2 и LCDR3, соответственно. Моноклональные антитела либо их антигенсвязывающие фрагменты выбирали из числа приведенных ниже. Следующие участки CDR определяли по системе нумерации Kabat.

Комбинация	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
A-I	SYWMH (SEQ ID NO: 1)	LIDPSDSDTT YNQKFKG (SEQ ID NO: 2)	SLDGYFDH (SEQ ID NO: 3)	RASENIYS YLA (SEQ ID NO: 4)	NARTLAE (SEQ ID NO: 5)	QHNYGTP WT (SEQ ID NO: 6)
A-II	TYWMH (SEQ ID NO: 7)	VIDPSDSYITY NQKFKG (SEQ ID NO: 8)	SLDGYFDY (SEQ ID NO: 9)	RASENIYS YLA (SEQ ID NO: 4)	NAKTLAE (SEQ ID NO: 10)	QHNYGTP WT (SEQ ID NO: 6)
A-III	SYWMH (SEQ ID NO: 1)	VIDPSDSDTT YNQKFKG (SEQ ID NO: 11)	SLDGYFDH (SEQ ID NO: 3)	RASGNIHN YLA (SEQ ID NO: 12)	NAKTLAD (SEQ ID NO: 13)	QHFWSPT WT (SEQ ID NO: 14)
A-IV	SYWMH (SEQ ID NO: 1)	VIDPSDSDTT YNQKFKG (SEQ ID NO: 11)	SLDGYFDH (SEQ ID NO: 3)	RASGNIHN YLA (SEQ ID NO: 12)	NTKTLAD (SEQ ID NO: 15)	QHFWSPT T (SEQ ID NO: 16)

Пример 2. Скрининг молекулы мышинного антитела

В настоящем изобретении иммунизировали мышей антигеном TSLP, оптимизировали иммунный метод, создавали библиотеку фагового дисплея и разработали метод скрининга антигенных участков. Конкретная конструкция и идентификация при скрининге библиотеки фагового дисплея имеет следующий вид.

Стадия 1. Иммунизация мышей антигеном TSLP

1. Экспериментальные животные:

вид и линия: мыши BALB/c, самки; вес: 18-20 г;

поставщик экспериментальных животных: Beijing HFK Bioscience Co., Ltd.

2. Иммунизация: мышей иммунизировали человеческим TSLP (ген синтезировали на фирме Nanjing Genscript Biotechnology Co., Ltd., наша компания конструировала

вектор, экспрессировала и очищала его) в качестве иммунного антигена.

Стадия 2. Конструирование фаговой библиотеки антител

Отбирали клетки из селезенки мышей с высокой активностью, выделяли из них тотальную РНК с помощью реагента Trizol (приобретали у фирмы Ambion, код продукции: 15596026), получали кДНК методом ОТ-ПЦР, использовали кДНК в качестве матрицы, проводили амплификацию методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью вырожденного праймера (вырожденный праймер приведен в документе: *Journal of Immunological Methods* 233 (2000) 167-177), и получали библиотеку генов вариабельной области тяжелой цепи (V_H) и библиотеку генов вариабельной области легкой цепи (V_L) иммунных антител мыши. Легкие и тяжелые цепи расщепляли дважды и соединяли с вектором, расщепленным на той же стадии, конструируя библиотеку генов в pScFv-DisB-HS-VH-VL, а вектор pScFv-DisB-HS подвергали модификации с помощью ряда методов клонирования генов для построения и экспрессии фаговой библиотеки одноцепочечных антител с помощью вектора pComb3 (приобретали у фирмы Biovector Science Lab). Модифицированный вектор назвали вектором pScFv-DisB-HS и получали его плазмидный профиль, как показано на фиг. 1. На основе этого вектора конструировали фаговую библиотеку иммунных антител мыши.

Стадия 3. Иммунную пробирку покрывали TSLP в качестве антигена, количество покрывающего антигена составляло 5 мкг/500 мкл на 1 пробирку, его фиксировали в течение ночи при 4°C, а затем плотно закрывали с 4% обезжиренным сухим молоком/ФСБТ, чтобы соответственно блокировать иммунную пробирку и фаговую библиотеку иммунных антител, и оставляли при комнатной температуре на 1 час. Запечатанную фаговую библиотеку иммунных антител вносили в иммунную пробирку для связывания антител с антигеном. Количество добавленного фага составляло примерно $10^9 \sim 10^{12}$. После проведения реакции при комнатной температуре в течение 1 ч смывали несвязавшийся фаг ФСБТ-ФСБ и элюировали 0,1 М глицином-HCl при pH 2,2. Наконец, элюированный раствор фага с антителами нейтрализовали 1,5 М трис-HCl при pH 8,8 примерно до pH 7,0.

Стадия 4. Нейтрализованными выше фагами инфицировали 10 мл раствора бактерий TG1, выращенных до логарифмической фазы, их неподвижно помещали в инкубатор при 37°C на 30 мин, отбирали часть бактериального раствора для серийных разведений и наносили на планшеты с 2YTAG для расчета продукции фага. Оставшийся бактериальный раствор центрифугировали, отбрасывая супернатант, а бактериальный осадок ресуспендировали в небольшом количестве культуральной среды и после отсасывания наносили на большой планшет с 2YTAG для подготовки к следующему

раунду скрининга.

Стадия 5. Инфицированные выше бактериальные клетки соскабливали с большого планшета, переносили в жидкую культуральную среду 2YTAG и культивировали до логарифмической фазы, добавляя M13KO7 для усиления суперинфекции фагов. Их культивировали в течение ночи при 28°C и 220 об/мин для получения фагов, а затем осаждали и очищали фаги с помощью PEG/NaCl для следующего раунда скрининга. Всего проводили один раунд скрининга с обогащением фаговой библиотеки.

Стадия 6. Скрининг клонов фагов, положительных по одноцепочечным антителам к TSLP. После одного раунда скрининга отбирали моноклональные колонии, которые были хорошо отделены, инокулировали их на 96-луночный планшет с глубокими лунками, добавляли жидкую культуральную среду 2YTAG и культивировали при 37°C и 220 об/мин до логарифмической фазы роста. В каждую лунку добавляли около 10^{10} вспомогательного фага M13KO7 и инфицировали неподвижно в течение 30 мин при 37°C. Затем центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин, отбрасывали супернатант, а бактериальные клетки ресуспендировали из осадка и культивировали в течение ночи при 28°C и 220 об/мин. После центрифугирования при 4000 об/мин и 4°C в течение 15 мин отсасывали супернатант с амплифицированным фагом для идентификации методом ELISA. Наконец, при скрининге получили 4 молекулы мышиных антител против TSLP с относительно высоким сродством, которым дали названия MA-I, MA-II, MA-III и MA-IV, соответственно. Полученные выше моноклональные антитела подвергали генетическому секвенированию для определения правильных последовательностей антител. После секвенирования у отобранных выше 4 моноклональных антител оказались следующие последовательности.

Молекула мышиного антитела	Последовательность вариабельной области тяжелой цепи	Последовательность вариабельной области легкой цепи
MA-I	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
MA-II	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20
MA-III	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22
MA-IV	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24

В частности, SEQ ID NO: 17 (аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи MA-I):

QVQLEQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGLIDPSDSDTTY
NQFKFKGKATLTVDTSSSTAYMQLGSLTSEDSAVYYCSRSLDGYFDHWGQGLVTVSA;

SEQ ID NO: 18 (аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи MA-I):

DIVMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKGKSPQLLVYNARTLAEGVPSRFS
GSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSFYQCQHHYGTPTWTFGGGKLEIK;

SEQ ID NO: 19 (аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи MA-II):

QVKLQQSGAELVKPGASVKMSCASGYTFTTYWMHWVKQRPGQGLEWIGVIDPSDSYITY
NQKFKGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRSLDGYFDYWGQGLVTVSA;

SEQ ID NO: 20 (аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи MA-II):

DIVLTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFS
GSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHNHYGTPWTFGGGKLEIK;

SEQ ID NO: 21 (аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи MA-III):

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVIDPSDSDTTY
NQKFKGKATLTVDTSSSTVYMQSSLTSEDSAVYYCTRSLDGYFDHWGQGLVTVSA;

SEQ ID NO: 22 (аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи MA-III):

DIVMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLADGVPSRF
SGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYQCQHFWSPTWTFGGGKLEIK;

SEQ ID NO: 23 (аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи MA-IV):

QVKLEQSGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVIDPSDSDTTY
NQKFKGKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRSLDGYFDHWGQGLVTVSA;

SEQ ID NO: 24 (аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи MA-IV):

DIVITQTPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQQKQKSPQLLVYNTKTLADGVPSRFS
GSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYQCQHFWSPTYTFGGGKLEIK.

С другой стороны, настоящим изобретением также предусмотрены моноклональные антитела против TSLP либо их антигенсвязывающие фрагменты, в частности, включающие варибельную область тяжелой цепи и варибельную область легкой цепи, причем варибельная область тяжелой цепи включает 3 определяющих комплементарность участка тяжелой цепи, представленные HCDR1, HCDR2 и HCDR3, соответственно, а варибельная область легкой цепи включает 3 определяющих комплементарность участка легкой цепи, представленные LCDR1, LCDR2 и LCDR3, соответственно. При этом HCDR1, HCDR2 и HCDR3 – это HCDR1, HCDR2 и HCDR3 варибельной области тяжелой цепи, представленные в SEQ ID NO: 17, 19, 21 или 23, соответственно; а LCDR1, LCDR2 и LCDR3 – это LCDR1, LCDR2 и LCDR3 варибельной области легкой цепи, представленные в SEQ ID NO: 18, 20, 22 или 24, соответственно.

Специалисты в данной области могут определить последовательности CDR из известной аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи или варибельной области легкой цепи на основе общепринятых систем нумерации (таких как Kabat, AbM, Chothia, Contact или IMGT). При определении CDR по системе нумерации Kabat последовательности CDR варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи были приведены в примере 1.

Пример 3. Сравнение аффинности моноклональных антител против TSLP на фагах методом ELISA на серийных разведениях

Выделяли и очищали моноклональные фаги 4 молекул мышинных моноклональных антител (МА-I, МА-II, МА-III, МА-III и МА-IV), полученные в примере 2, а затем проводили эксперимент методом ELISA на серийных разведениях фагов для определения сродства. В качестве контрольного антитела выбрали моноклональное антитело против TSLP тезепелумаб фирмы Amgen (также известное как AMG157, заявка на патент № CN201880026131.3, название патента – “Лечение астмы антителом против TSLP”), а конкретный способ заключается в следующем.

Наносили TSLP в растворе карбонатного буфера pH 9,6 по 100 нг/100 мкл на лунку, фиксировали в течение ночи при температуре 4°C и трижды промывали ФСБТ. Готовили 4-кратные серийные разведения фагов 4 моноклональных антител, отобранных в примере 2, вносили в каждую лунку по 100 мкл серийного разведения, и оставляли неподвижно при комнатной температуре на 1 час. Планшет для ELISA промывали ФСБТ, добавляли в него моноклональное антитело против M13 с HRP (приобретали у Bio-Viewshine, код продукции: GE27-9421-01), разведенное в ФСБТ, и оставляли при комнатной температуре на 1 час. Для проявления окраски использовали набор TMB Color kit, проявление делали при комнатной температуре в течение 10 мин, а после остановки реакции 2М H₂SO₄ проводили считывание планшета с результатами ELISA при 450 нм/630 нм и рассчитывали соответствующие значения EC₅₀. Получили следующие данные.

Клон	МА-I	МА-II	МА-III	МА-IV	Контрольное антитело
EC ₅₀	2,280	5,515	8,038	41,38	23,14

Исходя из приведенных выше данных и фиг. 2 видно, что все 4 различные молекулы мышинных антител, отобранные в примере 2, могут связываться с TSLP. Однако, по сравнению с другими 3 молекулами мышинных антител и контрольным антителом, моноклональное антитело МА-I, полученное по настоящему изобретению, обладает более высоким сродством к TSLP.

Пример 4

С учетом примера 2 в примере 4 настоящего изобретения дополнительно определяли, что молекулы мышинных антител также включают в себя константную

область тяжелой цепи мышинных антител и константную область легкой цепи мышинных антител, причем константную область тяжелой цепи мышинных антител выбирали из константной области тяжелой цепи типа IgG1, типа IgG2a, типа IgG2b или типа IgG3 мыши, при этом аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG1 приведена в SEQ ID NO: 26, аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG2a приведена в SEQ ID NO: 27, аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG2b приведена в SEQ ID NO: 28 и аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG3 приведена в SEQ ID NO: 29; а константная область легкой цепи мышинных антител представляет собой легкую цепь типа C_κ мыши, её аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 25; в частности, это следующие последовательности.

SEQ ID NO: 25 (аминокислотная последовательность константной области легкой цепи типа C_κ мыши):

ADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKD
STYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK;

SEQ ID NO: 26 (аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG1 мыши):

AKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLY
TLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKIKVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTI
TLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKE
FKCRVNSAAPPAPAEKTKTKGRPKAPQVYVYIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWN
GQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNPKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPG;

SEQ ID NO: 27 (аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG2a мыши):

AKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLY
TLSSSVTVTSSTWPSQSTTCNVAHPASSTKVDKIKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIK
DVLMLISLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDW
MSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIY
VEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSDGSYFMYSKLVKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSF
SRTPGK;

SEQ ID NO: 28 (аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG2b мыши):

AKTTPPSVYPLAPGCGDITGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSSVHTFPALLQSGLYT
MSSSVTVPSSTWPSQSTVTCVAHPASSTVVDKLEPSGPISTINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFI
FPPNIKDVLMISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPI
QHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYVLPPEEQLSRKDVSLTCLVVGFPN
GDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYSKLVNMTSKWEKTDVFCNVRHEGLKNYYLK
KTISRSPGK;

SEQ ID NO: 29 (аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG3 мыши):

ATTTAPSVYPLVPGCSDTSGSSVTLGCLVKG YFPEPVTVKWNYGALSSGVRTVSSVLQSGFY
SLSSLVTVPSSTWPSQTVICNV AHPASKTELIKRIEPRIPKPSTPPGSSCPPGNILGGPSVFIFPPKPKD
ALMISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVHVSWFVDNKEVHTAWTQPREAQYNSTFRVVSALPIQHQD
WMRGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGRAQTPQVYTIPPPREQMSK KKVSLTCLVTNFFSEAIS
VEWERNGELEQDYKNTPPILDSDGTYFLYSKLTVD TDSWLQGEIFTCVSVVHEALHNHHTQKNLSR
SPELELNETCAEAQDGLDGLWTTITIFISLFLLSVCYSASVTLFKVKWIFSSVVQVKQTAIPDYRN
MIGQGA.

Пример 5. Получение молекул мышинных антител против TSLP

С учетом примера 4 в примере 5 настоящего изобретения главным образом определяли, что молекулы мышинных антител включают в себя константную область тяжелой цепи типа IgG1 мыши (её аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 26) и константную область легкой цепи типа C_k мыши (её аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 25). В частности, способ получения антител заключался в следующем.

1. Кодированные гены V_H тяжелой цепи и V_L легкой цепи из 4 моноклональных антител, отобранных в примере 2, клонировали в вектор pTSE, содержащий гены константной области тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно (как показано на фиг. 3), предпочтительно константная область тяжелой цепи была типа IgG1 мыши (аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 26), а константная область легкой цепи была типа C_k мыши (аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 25). Структура вектора pTSE представлена на фиг. 3 (способ получения вектора pTSE можно найти в абзаце [0019] на стр. 3 описания в CN103525868A).

2. Для экспрессии антител проводили краткосрочную трансфекцию клеток HEK293E (приобретенных в Институте фундаментальной медицины Китайской академии медицинских наук, код продукции: GNHu43), и получали 4 моноклональных антитела путем очистки на аффинной колонке с белком А на приборе АКТА. В то же время определяли концентрацию белка с помощью набора BCA (приобретали у Beijing Huitian Dongfang Science and Technology Co., Ltd., код продукции: BCA0020), а размеры белков определяли методом ДСН-ПААГ. Результаты представлены на фиг. 4. Слева направо: в невозстанавливающих условиях – МА-I, МА-II, МА-III, МА-III и МА-IV, а также маркер молекулярной массы белка, в восстанавливающих условиях – МА-I, МА-II, МА-III, МА-III и МА-IV, мышинные моноклональные антитела против TSLP, последовательно, причем молекулярная масса каждой полосы соответствовала теоретической.

Пример 6. Эксперимент по связыванию мышинных антител с TSLP

Наносили TSLP в растворе карбонатного буфера pH 9,6 по 100 нг/100 мкл на лунку и фиксировали в течение ночи при температуре 4°C. Промывали ФСБТ по 300 мкл на лунку 5 раз, добавляли 1% БСА-ФСБТ и плотно закрывали при 37°C на 1 час. Добавляли мышинные антитела МА-I, МА-II, МА-III и МА-IV в разных разведениях, причем исходные максимальные концентрации всех 4 антител составляли 1 мкг/мл, из них делали 5-кратные серийные разведения, в общей сложности по 8 разведений для каждого антитела, и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Промывали ФСБТ по 300 мкл на лунку 5 раз, а затем добавляли козье антитело против IgG мыши с пероксидазой хрена (HRP) (приобретали у Solarbio, код продукта: SE131) в разведении 1:2000 с 1% БСА-ФСБТ и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Для проявления окраски использовали набор TMB Color kit по 100 мкл на лунку, проявление делали при комнатной температуре в течение 8 мин, а затем останавливали реакцию 2M H₂SO₄. Проводили считывание планшета с результатами ELISA при 450 нм/630 нм и рассчитывали соответствующие значения EC₅₀. Получили следующие данные.

Клон	МА-I	МА-II	МА-III	МА-IV
EC ₅₀ (нг/мл)	1,099	2,041	1,983	5,572

Исходя из приведенных выше данных и фиг. 5 видно, что все 4 различные отобранные мышинные антитела могут связываться с TSLP. Кроме того, среди этих 4 молекул мышинных антител у МА-I было самое низкое значение EC₅₀, что означает, что оно обладает лучшей способностью к связыванию с TSLP.

Пример 7. Эксперимент по конкурентному ингибированию между мышинными антителами и белком CRLF2 рецептора TSLP

Наносили CRLF2-Fc в растворе карбонатного буфера pH 9,6 при 200 нг/100 мкл на лунку и фиксировали в течение ночи при температуре 4°C. Промывали ФСБТ по 300 мкл на лунку 5 раз, добавляли 1% БСА-ФСБТ и плотно закрывали при 37°C на 1 час. Сначала добавляли TSLP-His, разведенный до 10 мкг/мл в 1% БСА-ФСБТ, по 50 мкл на лунку, а затем добавляли мышинные антитела МА-I, МА-II, МА-III и МА-IV и контрольное антитело в различных разведениях по 50 мкл на лунку, причем исходные максимальные концентрации всех 5 антител составляли 400 мкг/мл, из них делали 5-кратные серийные разведения, в общей сложности по 8 разведений для каждого антитела, и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. Промывали ФСБТ по 300 мкл на лунку 5 раз, а затем добавляли мышинное антитело против His-Tag с пероксидазой хрена (HRP) (приобретали у Beijing CWBio Technology Co., Ltd., код продукции: CW0285) в разведении 1:5000 с 2% БСА-ФСБТ и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Для проявления окраски использовали набор TMB Color kit по 100 мкл на лунку, с проявлением при комнатной температуре в

течение 10 мин, а затем останавливали реакцию 2М H₂SO₄. Проводили считывание планшета с результатами ELISA при 450 нм/630 нм и рассчитывали соответствующие значения IC₅₀. Получили следующие данные.

Клон	МА-I	МА-II	МА-III	МА-IV	Контрольное антитело
IC ₅₀ (нг/мл)	1523	15626	2402	11816	3460

Исходя из приведенных выше данных и фиг. 6 видно, что все 4 различные отобранные мышинные антитела могут конкурировать с рецепторным белком CRLF2. Кроме того, среди этих 4 молекул мышинных антител, полученных по настоящему изобретению, у МА-I было самое низкое значение IC₅₀, значительно лучше, чем у контрольного антитела, означая то, что оно может эффективно ингибировать связывание TSLP с рецепторным белком CRLF2.

Пример 8

В примере 4 настоящего изобретения дополнительно определяется, что моноклональное антитело либо его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой молекулу химерного антител, причем молекула химерного антитела включает в себя переменную область тяжелой цепи молекулы мышинного антитела, переменную область легкой цепи молекулы мышинного антитела и константную область гуманизованного антитела из примера 2. Константная область гуманизованного антитела включает константную область тяжелой цепи гуманизованного антитела и константную область легкой цепи гуманизованного антитела, причем константную область тяжелой цепи гуманизованного антитела выбирают из константной области тяжелой цепи типа IgG1, типа IgG2 или типа IgG4 человека. Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG1 приведена в SEQ ID NO: 30, аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG2 приведена в SEQ ID NO: 31, аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG4 приведена в SEQ ID NO: 32, а константная область легкой цепи гуманизованного антитела представляет собой константную область легкой цепи типа C_κ человека, и её аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 33.

SEQ ID NO: 30 (аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG1 человека):

```
ASTKGPSVFLPAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK;
```

SEQ ID NO: 31 (аминокислотная последовательность константной области тяжелой

цепи типа IgG2 человека):

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWL
NGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK;

SEQ ID NO: 32 (аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG4 человека):

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SLGK;

SEQ ID NO: 33 (аминокислотная последовательность константной области легкой цепи типа C_k человека):

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPPVTKSFRNGEC.

Пример 9. Получение молекулы химерного антитела

С учетом примера 8 в примере 9 настоящего изобретения дополнительно определяли, что константная область гуманизованного антитела включает в себя константную область тяжелой цепи типа IgG1 человека (её аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 30) и константную область легкой цепи типа C_k человека (её аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 33).

Конкретный способ получения

Гены варибельной области V_H тяжелой цепи (SEQ ID NO: 17) и варибельной области V_L легкой цепи (SEQ ID NO: 18) молекулы антитела MA-I, отобранного из фаговой библиотеки иммунных антител в примере 2, клонировали в вектор pTSE, содержащий гены константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи (как показано на фиг. 3), причем константная область тяжелой цепи была типа IgG1 человека (аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 30), а константная область легкой цепи была типа C_k человека (аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 33). Для экспрессии антитела проводили краткосрочную трансфекцию клеток HEK293E (приобретенных в Институте фундаментальной медицины Китайской академии медицинских наук, код продукции: GNHu43), чтобы получить химерное антитело CA-I.

Пример 10. Гуманизация молекулы мышинового антитела МА-I

Сначала сравнивали последовательность молекулы мышинового антитела МА-I из примера 2 с базой данных по линиям антител человека (v-base), чтобы найти линии легких и тяжелых цепей антител человека с относительно высокой гомологией, подходящие в качестве последовательностей-кандидатов. Затем прививали последовательности CDR молекулы мышинового антитела МА-I на гуманизованные последовательности-кандидаты для моделирования гомологии. А затем методом трехмерного структурного моделирования вычисляли ключевые каркасные аминокислотные остатки, которые могли бы играть важную роль в поддержании кольцевой структуры CDR с тем, чтобы разработать обратные мутации гуманизованных антител. Вариабельные области легкой и тяжелой цепей разработанного гуманизованного антитела, содержащие обратные мутации, подвергали оптимизации и синтезировали в Nanjing Genscript Biotechnology Co., Ltd., а затем соединяли с вектором для краткосрочной экспрессии. После анализа комбинаций гуманизованных легких и тяжелых цепей получали следующие молекулы гуманизованных антител: HA-I, HA-II, HA-III и HA-IV. У отобранных выше 4 моноклональных антител были следующие последовательности.

Моноклональное антитело	Вариабельная область тяжелой цепи	Вариабельная область легкой цепи
HA-I	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:35
HA-II	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:36
HA-III	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38
HA-IV	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:36

В частности, SEQ ID NO: 34 (аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи HA-I и HA-II):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGLIDPSDSDTTY
NQKFKGRATLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCSRSLDGYFDHWGQGTLVTVSS;

SEQ ID NO: 35 (аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи HA-I):

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKSPKLLVYNARTLAEGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHNYGTPWTFGGGKVEIK;

SEQ ID NO: 36 (аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи HA-II и HA-IV):

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLVYNARTLAEGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHNYGTPWTFGGGKVEIK;

SEQ ID NO: 37 (аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи HA-III и HA-IV):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGLIDPSDSDTTY
NQKFKGRATMTVDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARSLDGYFDHWGQGLVTVSS;

SEQ ID NO: 38 (аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи HA-III):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLVYNARTLAEGVPSRFS
GSGSGTDFLTLISSLQPEDFATYYCQHHYGTPWTFGGGTKVEIK.

Пример 11

С учетом примера 10 в примере 11 настоящего изобретения дополнительно определяли, что молекула гуманизованного антитела также включала в себя константную область гуманизованного антитела; причем константная область гуманизованного антитела включала константную область тяжелой цепи гуманизованного антитела и константную область легкой цепи гуманизованного антитела, при этом константную область тяжелой цепи гуманизованного антитела выбирали из константной области тяжелой цепи типа IgG1, типа IgG2 или типа IgG4 человека, причем аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG1 приведена в SEQ ID NO: 30, аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG2 приведена в SEQ ID NO: 31, аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG4 приведена в SEQ ID NO: 32, а константная область легкой цепи гуманизованного антитела представляет собой константную область легкой цепи типа C_k человека, и её аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 33.

Конкретные последовательности константной области приведенного выше гуманизованного антитела были такими же, как в примере 8.

Пример 12. Получение молекулы гуманизованного антитела

Исходя из примера 11, в примере 12 настоящего изобретения дополнительно определяется, что константная область гуманизованных антител включает в себя константную область тяжелой цепи типа IgG1 человека (её аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 30) и константную область легкой цепи типа C_k человека (её аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 33).

Кодирующие гены V_H тяжелой цепи и V_L легкой цепи из 4 молекул гуманизованных антител, полученных при гуманизации в приведенном выше примере 10, клонировали в вектор pTSE, содержащий гены константной области тяжелой цепи и легкой цепи, соответственно (как показано на фиг. 3), причем константная область тяжелой цепи была типа IgG1 человека (аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 30), а константная область легкой цепи была типа C_k человека

(аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 33).

Для экспрессии антител проводили краткосрочную трансфекцию контрольного антитела и молекул гуманизованных антител HA-I, HA-II, HA-III и HA-IV в клетки HEK293 (приобретенные в Институте фундаментальной медицины Китайской академии медицинских наук, код продукции: GNHu43) и получали моноклональные антитела путем очистки на аффинной колонке с белком А на приборе АКТА. В то же время определяли концентрацию белка с помощью набора BCA (приобретали у Beijing Huitian Dongfang Science and Technology Co., Ltd., код продукции: BCA0020), а размеры белков определяли методом SDS-PAGE. Результаты представлены на фиг. 7. Слева направо: невосстановительный гель – маркеры молекулярной массы белков Marker1, HA-I, HA-II, HA-III и HA-IV, химерное антитело CA-I, полученное в примере 9, и контрольное антитело; восстановительный гель – маркеры молекулярной массы белков Marker2, HA-I, HA-II, HA-III и HA-IV, химерное антитело CA-I и контрольное антитело, последовательно, причем молекулярная масса каждой полосы соответствовала теории.

Пример 13

Исходя из вышеприведенных примеров, в примере 13 настоящего изобретения дополнительно определяется, что молекулы гуманизованных антител представляют собой полноразмерные антитела или фрагменты антител, причем молекулы гуманизованных антител включают одно или комбинацию Fab, F(ab)₂, Fv или scFv.

Пример 14

Исходя из вышеприведенных примеров, в примере 14 настоящего изобретения дополнительно определяются следующие схемы.

Так, настоящим изобретением дополнительно предусмотрены белки, которые содержат моноклональные антитела против TSLP либо их антигенсвязывающие фрагменты, как определено в любом из приведенных выше примеров.

Настоящим изобретением также предусмотрены молекулы полинуклеотидов, которые кодируют моноклональные антитела против TSLP либо их антигенсвязывающие фрагменты, как определено в любом из приведенных выше примеров.

Настоящим изобретением также предусмотрены векторы для экспрессии рекомбинантной ДНК, которые содержат молекулы полинуклеотидов, определенные выше.

Настоящим изобретением также предусмотрены клетка-хозяин, трансфицированная вектором для экспрессии рекомбинантной ДНК, определенным выше, причем клетка-хозяин включает прокариотическую клетку, дрожжевую клетку, клетку насекомых или клетку млекопитающих; и

предпочтительно клетка-хозяин – это клетка млекопитающих, и клеткой млекопитающих является клетка HEK293, клетка CHO или клетка NS0.

Настоящим изобретением также предусмотрены лекарственные средства, которые содержат моноклональные антитела против TSLP либо их антигенсвязывающие фрагменты, как определено в любом из приведенных выше примеров.

Настоящим изобретением также предусмотрено применение моноклональных антител против TSLP либо их антигенсвязывающих фрагментов при получении лекарственных средств для лечения иммунологического заболевания или рака.

Настоящим изобретением предусмотрен способ лечения или профилактики заболевания, опосредованного TSLP, который включает введение терапевтически эффективного количества моноклонального антитела против TSLP нуждающемуся в этом индивиду, а заболевание включает иммунологическое заболевание или рак. Предпочтительно иммунологическое заболевание включает, без ограничения, астму, хроническую обструктивную болезнь легких, хроническую эозинофильную пневмонию, идиопатический фиброз легких и аллергический дерматит; а астма охватывает тяжелую астму, эозинофильную или неэозинофильную астму и слабоэозинофильную астму.

Предпочтительно рак включает, без ограничения, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легких, меланому, рак простаты, рак почек, колоректальный рак или рак молочной железы.

Пример 15. Эксперимент по связыванию молекулы гуманизованного антитела с TSLP

Наносили TSLP-His в растворе карбонатного буфера pH 9,6 по 200 нг/100 мкл на лунку и фиксировали в течение ночи при температуре 4°C. Промывали ФСБТ по 300 мкл на лунку 5 раз, добавляли 1% БСА-ФСБТ и плотно закрывали при 37°C на 1 час. Добавляли гуманизованные антитела HA-I, HA-II, HA-III и HA-IV, а также химерное антитело CA-I, полученное в примере 9, и контрольное антитело в различных разведениях, причем исходные максимальные концентрации всех 6 антител составляли 5 мкг/мл, из них делали 5-кратные серийные разведения, в общей сложности по 8 разведений для каждого антитела, и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Промывали ФСБТ по 300 мкл на лунку 5 раз, а затем добавляли козье антитело против IgG человека с пероксидазой хрена (HRP) (приобретали у Beijing ZSGB Biotechnology Co., Ltd., код продукции: ZB-2304) в разведении 1:5000 с 1% БСА-ФСБТ и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Для проявления окраски использовали набор TMB Color kit по 100 мкл на лунку, проявление осуществляли при комнатной температуре в течение 5 мин, а затем останавливали реакцию 2M H₂SO₄. Проводили считывание планшета с результатами

ELISA при 450 нм/630 нм и рассчитывали соответствующие значения EC_{50} . Получили следующие данные.

Клон	HA-I	HA-II	HA-III	HA-IV	Химерное антитело CA-I	Контрольное антитело
EC_{50} (нг/мл)	10,16	20,12	32,90	25,57	13,06	54,99

Исходя из приведенных выше данных и экспериментальных результатов, представленных на фиг. 8, видно, что все 4 различных молекулы гуманизованных антител могут связываться с TSLP, причем значения EC_{50} у 4 различных моноклональных антител, полученных по настоящему изобретению, были значительно ниже, чем у контрольного антитела, указывая на то, что моноклональные антитела, полученные по настоящему изобретению, обладают сильной способностью к связыванию и высоким сродством к TSLP. Кроме того, из фиг. 8 и приведенных выше данных можно сделать вывод, что среди 4 различных моноклональных антител самое низкое значение EC_{50} было у HA-I, что указывает на то, что оно обладает наилучшей способностью к связыванию и самым высоким сродством к TSLP; и в то же время значение EC_{50} у HA-I было близким к таковому у химерного антитела CA-I, что указывает на то, что гуманизованное HA-I сохраняет высокое сродство исходного мышинового антитела MA-I к TSLP.

Пример 16. Эксперимент по конкурентному ингибированию между гуманизованным антителом и контрольным антителом

Наносили TSLP-His в растворе карбонатного буфера pH 9,6 по 100 нг/100 мкл на лунку и фиксировали в течение ночи при температуре 4°C. Промывали ФСБТ по 300 мкл на лунку 5 раз, добавляли 1% БСА-ФСБТ и плотно закрывали при 37°C на 1 час. Сначала добавляли HA-I, HA-II, HA-III, HA-IV и химерное антитело CA-I, разведенные до 4 мкг/мл в 1% БСА-ФСБТ, по 50 мкл на лунку, а затем добавляли различные разведения контрольных антител по 50 мкл на лунку, причем исходные максимальные концентрации контрольных антител составляли 400 мкг/мл, из них делали 3-кратные серийные разведения, в общей сложности 11 разведений, и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. Промывали ФСБТ по 300 мкл на лунку 5 раз, а затем добавляли антитело против IgG1 человека с пероксидазой хрена (HRP) (приобретали у Sigma, код продукции: SAB 4200768) в разведении 1:5000 с 1% БСА-ФСБТ и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Для проявления окраски использовали набор TMB Color kit по 100 мкл на лунку, с проявлением при комнатной температуре в течение 10 мин, а затем останавливали реакцию 2M H₂SO₄. Проводили считывание планшета с результатами ELISA при 450 нм/630 нм и рассчитывали соответствующие значения IC_{50} . Получили следующие данные.

Клон	HA-I	HA-II	HA-III	HA-IV	Химерное антитело CA-I
IC_{50} (нг/мл)	475,4	626,4	1633	977,7	627,3

Исходя из приведенных выше данных и фиг. 9 видно, что все 4 отобранные гуманизованные антитела и химерное антитело могут ингибировать связывание TSLP с контрольным антителом. В то же время среди этих 4-х молекул гуманизованных антител самое низкое значение IC_{50} было у НА-I, а его ингибирующий эффект был самым лучшим.

Пример 17. Эксперимент по перекрестному связыванию между гуманизованным антителом и TSLP от других видов

Наносили TSLP-His человека, TSLP-His мыши (приобретали у Beijing Sino Biological Inc., код продукции: 51005-M08H) и TSLP-His обезьяны (приобретали у Noboprotein Technology Co., Ltd., код продукции: CR62), соответственно, в растворе карбонатного буфера pH 9,6 по 100 нг/100 мкл на лунку и фиксировали в течение ночи при температуре 4°C. Промывали ФСБТ по 300 мкл на лунку 5 раз, добавляли 1% БСА-ФСБТ и плотно закрывали при 37°C на 1 час. Добавляли гуманизованные антитела НА-I, НА-II, НА-III и НА-IV различных разведениях, причем исходные максимальные концентрации всех 4 гуманизованных антител составляли 16 мкг/мл, из них делали 4-кратные серийные разведения, в общей сложности по 8 разведений для каждого антитела, и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Промывали ФСБТ по 300 мкл на лунку 5 раз, а затем добавляли козье антитело против IgG1 человека с пероксидазой хрена (HRP) в разведении 1:5000 с 1% БСА-ФСБТ и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Для проявления окраски использовали набор TMB Color kit по 100 мкл на лунку, проявление осуществляли при комнатной температуре в течение 5 мин, а затем останавливали реакцию 2M H₂SO₄. Проводили считывание планшета с результатами ELISA при 450 нм/630 нм и рассчитывали соответствующие значения EC_{50} . Получили следующие данные.

Клон + TSLP (человека)	НА-I	НА-II	НА-III	НА-IV
EC_{50} (нг/мл)	9,94	17,17	27,1	21,34
Клон + TSLP (макаки)	НА-I	НА-II	НА-III	НА-IV
EC_{50} (нг/мл)	27,32	50,77	89,25	50,8
Клон + TSLP (мыши)	НА-I	НА-II	НА-III	НА-IV
EC_{50} (нг/мл)	н/п	н/п	н/п	н/п

Исходя из приведенных выше данных и фиг. 10 видно, что все 4 отобранные гуманизованные антитела связываются с TSLP человека и с TSLP яванской макаки, но не с TSLP мыши. Кроме того, среди этих 4-х молекул гуманизованных антител самое низкое значение EC_{50} с TSLP человека и яванской макаки было у НА-I, указывая на его сильную способность к связыванию. Его можно использовать для фармакологических исследований по токсичности и для оценки безопасности на экспериментальной модели у животных – яванской макаки.

Пример 18. Эксперимент по ингибированию связывания между TSLP и рецептором на клеточной поверхности моноклональным антителом против TSLP

Клетки генно-инженерной линии BaF/3-TSLPR расщепляли и подсчитывали, а затем разбавляли до 1×10^6 клеток на мл разбавителем для образцов (его ингредиенты включают 90% средой Дульбекко в модификации Искова (IMDM), 10% ФБС и 300 мкг/мл гигромицина) и наносили на 96-луночный планшет по 100 мкл на лунку. Гуманизованные антитела HA-I, HA-II, HA-III и HA-IV и контрольное антитело, соответственно, разбавляли разбавителем для образцов до начальной концентрации 200 мкг/мл и делали 3-кратные серийные разведения, в общей сложности по 8 разведений. Эти разведения гуманизованных антител HA-I, HA-II, HA-III и HA-IV и контрольного антитела, соответственно, добавляли по 50 мкл на лунку в 96-луночный планшет, содержащий по 100 мкл клеток BaF/3-TSLPR. Антиген TSLP разбавляли до 8 мкг/мл разбавителем для образцов и добавляли по 50 мкл на лунку в указанный выше планшет, содержащий клетки BaF/3-TSLPR, гуманизованные антитела и контрольное антитело. После осторожного перемешивания до однородности помещали 96-луночный планшет в инкубатор при 4°C на 1 час. По завершении инкубации его центрифугировали при 3000 об/мин, чтобы избавиться от супернатанта, а клеточный осадок собирали. На планшет добавляли предварительно разведенное козье антитело против IgG-Fc человека (приобретенное у Southern Biotech, код продукции: 2048-30) по 100 мкл на лунку, перемешивали до однородности с клеточным осадком в каждой лунке и инкубировали при 4°C в течение 1 ч. По завершении инкубации в каждую лунку добавляли по 100 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) для промывки клеток, центрифугировали планшет при 3000 об/мин, чтобы избавиться от супернатанта, и в каждую лунку добавляли по 100 мкл ФСБ, чтобы ресуспендировать клеточный осадок. Проводили детекцию проточной цитометрией на аппарате. Собирали данные и рассчитывали соответствующие значения IC₅₀. Получили следующие данные.

Клон	HA-I	HA-II	HA-III	HA-IV	Контрольное антитело
IC ₅₀ (мкг/мл)	0,724	0,921	1,241	1,133	1,477

Исходя из приведенных выше данных и фиг. 11 видно, что все 4 отобранные гуманизованные антитела и контрольное антитело могут конкурировать с TSLP за связывание с рецептором TSLPR на клеточной поверхности. Кроме того, среди этих 4-х молекул гуманизованных антител у HA-I было самое низкое значение IC₅₀, даже лучше, чем у контрольного антитела, указывая на то, что оно обладает хорошим блокирующим действием на связывание TSLP со своим рецептором на клеточном уровне.

Пример 19. Определение биологической активности моноклонального антитела против TSLP (метод репортерного гена)

Клетки BaF/3 (оригинальные В-клетки мыши, приобретенные в Центре клеточных

ресурсов Института фундаментальной медицины Китайской Академии медицинских наук, код продукции: 3111C0001CCC000095), экспрессирующие TSLPR, IL-7Ra и STAT5-Luc, обрабатывали и подсчитывали, а затем разбавляли до 1×10^6 клеток на мл разбавителем для образцов (его ингредиенты включают 90% средой Дульбекко в модификации Искова (IMDM), 10% ФБС, 300 мкг/мл гигромицина, 0,5 мкг/мл пурамицина и 600 мкг/мл генетицина), добавляли антиген TSLP-RAS-His так, чтобы его концентрация составляла 160 нг/мл, и после осторожного перемешивания до однородности наносили раствор с клетками на 96-луночный планшет по 50 мкл на лунку. Гуманизованные антитела HA-I, HA-II, HA-III и HA-IV и контрольное антитело, соответственно, разбавляли разбавителем для образцов до начальной концентрации 15 мкг/мл и делали 3-кратные серийные разведения, в общей сложности по 8 разведений, из них готовили по две повторных лунки для каждой концентрации образца. Эти разведения HA-I, HA-II, HA-III и HA-IV и контрольного антитела, соответственно, наносили на 96-луночный планшет, содержащий по 50 мкл смешанного раствора с клетками, и после осторожного перемешивания до однородности помещали планшет в инкубатор для культивирования клеток и инкубировали в течение 5 ч в условиях культивирования при 37°C и 5% CO₂. Через 5 часов вынимали 96-луночный планшет и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин. Раствор отбрасывали, добавляли буфер для лизиса Glo (приобретали у Promega, код продукции: E2661) по 5 мкл на лунку и проводили лизис при комнатной температуре в течение 5 мин, осторожно постукивая по планшету с тем, чтобы раствор для лизиса клеток равномерно перемешался, переносили раствор для лизиса клеток в 384-луночный планшет по 10 мкл на лунку, добавляли равное количество смеси для анализа люциферазы Bright-Glo™ и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 2-15 мин. Считывали значения флуоресценции с планшета с результатами ELISA и рассчитывали соответствующие значения IC₅₀. Получили следующие данные.

Клон	HA-I	HA-II	HA-III	HA-IV	Контрольное антитело
IC ₅₀ (мкг/мл)	289,2	378,3	469,4	444,9	514,8

Исходя из приведенных выше данных и фиг. 12 видно, что все 4 отобранных гуманизованных антитела и контрольное антитело могут связываться с TSLP и конкурировать с ним, ингибируя связывание TSLP с рецепторным комплексом, и оказывать свое действие, блокируя внутриклеточные сигнальные пути. Создание генно-инженерной линии клеток BaF/3-TSLPR-IL7Ra-STAT5-Luc может имитировать реакцию пролиферации тучных клеток человека под действием TSLP. TSLP стимулировал и усиливал экспрессию внутриклеточного сигнала пролиферации (STAT5-Luc) путем связывания с рецепторами TSLPR и IL7Ra на клеточной поверхности. Эти 4 молекулы гуманизованных антител могут эффективно блокировать связывание между TSLP и

рецепторами на клеточной поверхности, тем самым ингибируя возникновение и развитие внутриклеточных сигналов пролиферации. Кроме того, среди этих 4-х молекул гуманизованных антител у НА-I было самое низкое значение IC_{50} , значительно лучше, чем у контрольного антитела, указывая на то, что оно может блокировать связывание TSLP со своими рецепторами на клеточном уровне и оказывать наилучшее ингибирующее действие на пролиферацию клеток.

Пример 20. Блокирование индуцированного TSLP высвобождения хемокина в клетке mDC моноклональным антителом против TSLP

Клетки МКПК ресуспендировали, использовали набор для отбора и получения зрелых дендритных клеток (ДК), доводили плотность клеток до 4×10^5 клеток/мл разбавителем для образцов (его ингредиенты включали 90% 1640 и 10% ФБС) и вносили суспензию клеток в 96-луночный планшет по 50 мкл на лунку. Гуманизованные антитела НА-I, НА-II, НА-III и НА-IV и контрольное антитело, соответственно, разбавляли разбавителем для образцов до начальной концентрации 80 нг/мл и делали 3-кратные серийные разведения, в общей сложности по 8 разведений, из них готовили по две повторных лунки для каждой концентрации образца. Их наносили на 96-луночный планшет, содержащий зрелые клетки ДК, по 25 мкл на лунку. Белок TSLP разбавляли разбавителем для образцов до 80 нг/мл и наносили на 96-луночный планшет, содержащий зрелые клетки ДК, гуманизованные антитела и контрольное антитело, по 25 мкл на лунку. После осторожного перемешивания до однородности 96-луночный планшет помещали в инкубатор с CO_2 и культивировали при $37^\circ C$ в течение ночи. Примерно через 24 часа отбирали супернатанты по 50 мкл с лунки. В соответствии с инструкцией к набору для ELISA на TARC у человека (приобретали у Dakeweі Biotechnology Co., Ltd., код продукции: 1117542) проводили определение TARC. Сначала с помощью разбавителя из набора разбавляли супернатанты в 3 раза и перемешивали до однородности. Разбавленные супернатанты и стандартные вещества вносили в лунки для образцов по 100 мкл на лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. По завершении инкубации лунки планшета 3 раза промывали промывочным раствором. Добавляли разведенное разбавителем биотинилированное антитело по 100 мкл на лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. По завершении инкубации лунки планшета 3 раза отмывали промывочным раствором. Добавляли рабочий раствор стрептавидина-HRP по 100 мкл на лунку и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут. По завершении инкубации лунки планшета 3 раза отмывали промывочным раствором. Добавляли раствор ТМВ для проявления окраски по 100 мкл на лунку и инкубировали в темноте при комнатной температуре примерно 15 мин, после чего останавливали развитие

окраски с помощью стоп-раствора по 100 мкл на лунку. Считывали значения OD при 450 нм с планшета для ELISA и рассчитывали соответствующие значения IC₅₀. Получили следующие данные.

Клон	HA-I	HA-II	HA-III	HA-IV	Контрольное антитело
IC ₅₀ (нг/мл)	100,1	241,1	313,4	261,3	584,0

Исходя из приведенных выше данных и из фиг. 13 видно, что все 4 отобранных гуманизованные антитела и контрольное антитело могут ингибировать высвобождение хемокина TARC из активированных TSLP клеток зДК. Кроме того, среди этих 4-х молекул гуманизованных антител у HA-I было самое низкое значение IC₅₀, значительно лучше, чем у контрольного антитела, указывая на то, что оно может эффективно ингибировать активирующее действие TSLP на зДК на клеточном уровне и оказывать наилучший ингибирующий эффект.

Пример 21. Оценка термостабильности моноклонального антитела HA-I против TSLP

Моноклональное антитело HA-I против TSLP переводили в буферную систему ФСБ с помощью ультрафильтрации, центрифугировали при 12000 об/мин и 4°C в течение 5 мин и определяли термостабильность моноклонального антитела HA-I против TSLP с помощью многофункциональной системы анализа термостабильности белков (приобретали у фирмы Unchained Labs). Отслеживая изменения эндогенной флуоресценции белка в зависимости от температуры (начиная с 25°C и с нагреванием до 95°C со скоростью 0,3°C/мин), выявляли изменения конформации белка, определяли температуру плавления белка T_m и оценивали стабильность конформации белка. При агрегации образца могла произойти интерференция рассеянных световых волн и усиление сигнала рассеянного света. Определяли коллоидную стабильность белка с помощью статического рассеяния света (что обозначается как T_{agg}), а результаты представлены в следующей таблице и на фиг. 14.

Образец	T _m (°C)	T _{agg} (°C)
Моноклональное антитело HA-I против TSLP, 2 мг/мл	71,7	83,0

Как видно из приведенной выше таблицы и фиг. 14, температура плавления моноклонального антитела HA-I против TSLP составляла 71,7°C, а среднее значение T_{agg} составляло 83,0°C, оно проявляло хорошую конформацию и коллоидную стабильность.

Пример 22. Подкожное введение яванским макакам моноклонального антитела против TSLP для 4-недельного теста на токсичность

Целью исследования было изучение токсичности при подкожном введении яванским макакам моноклонального антитела против TSLP 1 раз в неделю на протяжении 4 недель.

(1) Информация об исследуемом веществе: моноклональное антитело HA-I против TSLP в составе раствора для инъекций (вспомогательные вещества включают гистидин, гидрохлорид гистидина, сорбитол и полисорбат 80).

Информация о контрольном веществе: в качестве контроля использовали буферный раствор для моноклонального антитела HA-I против TSLP (ингредиенты включали гистидин, гидрохлорид гистидина, сорбитол и полисорбат 80, за исключением фармацевтического ингредиента – моноклонального антитела HA-I против TSLP, остальные ингредиенты были такими же, как и в растворе для инъекций).

(2) Поставщик: Beijing Eastern Biotech Biotechnology Co., Ltd.

(3) Экспериментальные животные

Вид и линия: яванские макаки

Возраст: 2,5-5 лет. Вес: 2-5 кг

Пол: самки и самцы

Количество животных: 8, по 4 самки и 4 самца

(4) Разбивка на группы и схема введения

Группа	Контрольное вещество/ исследуемое вещество	Доза (мг/кг)	Объем (мл/кг)	Количество животных (животные/пол)
1	буферный раствор для моноклонального антитела HA-I против TSLP	0	2,00	1 самка и 1 самец
2	раствор для инъекций моноклонального антитела HA-I против TSLP	30	0,20	1 самка и 1 самец
3	раствор для инъекций моноклонального антитела HA-I против TSLP	100	0,67	1 самка и 1 самец
4	раствор для инъекций моноклонального антитела HA-I против TSLP	300	2,00	1 самка и 1 самец

При подкожном введении первое введение отмечали как день D1, а затем проводили введение 1 раз в неделю на протяжении 4 недель, в общей сложности 5 введений.

В этом эксперименте оценивали следующие параметры: проявления клинических симптомов, масса тела, потребление пищи, температура тела, определение сопутствующих показателей безопасности и фармакологии, электрокардиограмма, артериальное давление, офтальмологический осмотр, клинико-патологическое обследование (число клеток крови, функция свертывания, биохимический анализ крови и анализ мочи), иммунологические показатели (фенотип иммунных клеток, цитокины, иммуноглобулины и комплементы), антитела к лекарственным препаратам и токсикокинетика.

Результаты эксперимента. За время эксперимента в группах 2-4 не отмечалось существенных или регулярных аномальных изменений по всем показателям –

клиническим проявлениям, массе тела, температуре тела, параметрам электрокардиограммы, числу клеток крови, биохимическому анализу крови, анализу мочи, уровню Т-лимфоцитов по подгруппам и общему состоянию анатомии животных.

Кроме того, у самок животных в дозовой группе 300 мг/кг отмечалось повышение уровня фибриногена перед вторым введением (D8) и на следующий день после третьего введения (D16), оно возвращалось к норме на следующий день после последнего введения (D30). У других животных никаких отклонений от нормы не наблюдалось. Через 1-2 часа после первого введения (D1) повышался уровень IL-6 у самцов в дозовой группе 30 мг/кг, а у самок в дозовой группе 300 мг/кг повышался уровень IL-10, но все это прошло на следующий день. На следующий день после первого введения (D2) повышался уровень IL-6 как у самцов, так и у самок в дозовой группе 300 мг/кг, но возвращался к норме перед введением в день D8. Перед вторым введением (D8) также повышался уровень IL-10 у самок в дозовой группе 300 мг/кг, но возвращался к норме в день D29, а у остальных не наблюдалось существенных аномальных изменений.

За время эксперимента ни в одной группе животных не отмечалось никаких АЛП.

Токсикокинетические результаты показали, что яванским макакам подкожно вводилось моноклональное антитело HA-I против TSLP в дозах 30, 100 и 300 мг/кг, соответственно. После первого и четвертого введения концентрация препарата в крови и экспозиция повышалась с возрастанием дозы и не наблюдалось существенных гендерных отличий по основным токсикокинетическим параметрам. После введения 1 раз в неделю на протяжении 4 недель у яванских макак наблюдалось небольшое накопление EB070 (коэффициент накопления составлял 1,49-2,71).

Пример 23. Подкожное введение яванским макакам моноклонального антитела против TSLP для 13-недельного теста на токсичность

Исходя из примера 22, целью данного экспериментального исследования была оценка токсических реакций и токсикокинетического режима у моноклонального антитела против TSLP при подкожном введении яванским макакам 1 раз в неделю на протяжении 13 недель, а также условий восстановления от токсичности после 6-недельного прекращения приема препарата путем инъекций моноклонального антитела против TSLP.

(1) Информация об исследуемом веществе: моноклональное антитело HA-I против TSLP в составе раствора для инъекций (вспомогательные вещества включают гистидин, гидрохлорид гистидина, сорбитол и полисорбат 80).

Информация о контрольном веществе: в качестве контроля использовали буферный раствор для моноклонального антитела HA-I против TSLP (ингредиенты включали гистидин, гидрохлорид гистидина, сорбитол и полисорбат 80, за исключением

фармацевтического ингредиента – моноклонального антитела HA-I против TSLP, остальные ингредиенты были такими же, как и в растворе для инъекций).

(2) Поставщик: Beijing Eastern Biotech Biotechnology Co., Ltd.

(3) Экспериментальные животные

Вид и линия: яванские макаки

Возраст: 3-5 лет. Вес: 2-5 кг

Пол: самки и самцы

Количество животных: 40, по 20 самок и 20 самцов

Разбивка на группы и схема введения

Группа	Контрольное вещество/ исследуемое вещество	Доза (мг/кг)	Концентрация (мг/мл)	Объем (мл/кг)	Количество животных (животные/пол)
1	буферный раствор для моноклонального антитела HA-I против TSLP	0	0	2,00	3 самки и 2 самца, соответственно
2	раствор для инъекций моноклонального антитела HA-I против TSLP	10	150	0,067	3 самки и 2 самца, соответственно
3	раствор для инъекций моноклонального антитела HA-I против TSLP	60	150	0,40	3 самки и 2 самца, соответственно
4	раствор для инъекций моноклонального антитела HA-I против TSLP	300	150	2,00	3 самки и 2 самца, соответственно

При подкожном введении первое введение отмечали как день D1, а затем проводили введение 1 раз в неделю на протяжении 13 недель, в общей сложности 14 введений; и в этом эксперименте оценивали следующие параметры: проявления клинических симптомов, масса тела, потребление пищи, температура тела, определение сопутствующих показателей безопасности и фармакологии, электрокардиограмма, артериальное давление, офтальмологический осмотр, клинико-патологическое обследование (число клеток крови, функция свертывания, биохимический анализ крови и анализ мочи), иммунологические показатели (фенотип иммунных клеток, цитокины, иммуноглобулины и комплементы), антитела к лекарственным препаратам и токсикокинетика.

Предварительные результаты эксперимента показали, что после неоднократного подкожного введения моноклонального антитела HA-I против TSLP у яванских макак не наблюдалось существенных отклонений по клиническим проявлениям, массе тела, температуре тела, при офтальмологическом осмотре и общем вскрытии.

Настоящее изобретение не ограничивается предпочтительными способами

реализации, описанными выше, и любые лица могут получить какие-то другие формы продукции, исходя из духа настоящего изобретения. Однако, независимо от каких-либо изменений в его форме или структуре, любые технические схемы, которые совпадают или сходны с настоящим изобретением, попадают в сферу охраны настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело против TSLP или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, причем переменная область тяжелой цепи содержит 3 определяющих комплементарных участка тяжелой цепи, представленных HCDR1, HCDR2 и HCDR3, соответственно, переменная область легкой цепи содержит 3 определяющих комплементарных участка легкой цепи, представленных LCDR1, LCDR2 и LCDR3, соответственно, а моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из числа следующих:

A-I: определяющий комплементарный участок тяжелой цепи HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, определяющий комплементарный участок тяжелой цепи HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, определяющий комплементарный участок тяжелой цепи HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, определяющий комплементарный участок легкой цепи LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, определяющий комплементарный участок легкой цепи LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5, а определяющий комплементарный участок легкой цепи LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6;

A-II: определяющий комплементарный участок тяжелой цепи HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, определяющий комплементарный участок тяжелой цепи HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8, определяющий комплементарный участок тяжелой цепи HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, определяющий комплементарный участок легкой цепи LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, определяющий комплементарный участок легкой цепи LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10, а определяющий комплементарный участок легкой цепи LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6;

A-III: определяющий комплементарный участок тяжелой цепи HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, определяющий комплементарный участок тяжелой цепи HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, определяющий комплементарный

участок тяжелой цепи HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, определяющий комплементарность участок легкой цепи LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, определяющий комплементарность участок легкой цепи LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, а определяющий комплементарность участок легкой цепи LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14; и

A-IV: определяющий комплементарность участок тяжелой цепи HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, определяющий комплементарность участок тяжелой цепи HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, определяющий комплементарность участок тяжелой цепи HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, определяющий комплементарность участок легкой цепи LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, определяющий комплементарность участок легкой цепи LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15, а определяющий комплементарность участок легкой цепи LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16.

2. Моноклональное антитело против TSLP или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, при этом моноклональное антитело против TSLP или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу мышинового антитела, причем молекула мышинового антитела выбрана из числа следующих:

МА-I: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18;

МА-II: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20;

МА-III: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22; и

МА-IV: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24;

предпочтительно молекула мышинового антитела представляет собой МА-I.

3. Моноклональное антитело против TSLP или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, при этом молекула мышинового антитела также содержит константную область тяжелой цепи мышинового антитела и константную область легкой цепи мышинового антитела, причем константная область тяжелой цепи мышинового антитела выбрана из константной области мыши типа IgG1, типа IgG2a, типа IgG2b или типа IgG3, при этом аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG1 приведена в SEQ ID NO: 26, аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG2a приведена в SEQ ID NO: 27, аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG2b приведена в SEQ ID NO: 28 и аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG3 приведена в SEQ ID NO: 29; а константная область легкой цепи мышинового антитела представляет собой легкую цепь мыши типа C_k, её аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 25; а

предпочтительно молекула мышинового антитела содержит константную область тяжелой цепи мыши типа IgG1 и константную область легкой цепи мыши типа C_k.

4. Моноклональное антитело против TSLP или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, при этом моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу химерного антитела, причем молекула химерного антитела содержит переменную область тяжелой цепи молекулы мышинового антитела, переменную область легкой цепи молекулы мышинового антитела и константную область гуманизованного антитела.

5. Моноклональное антитело против TSLP или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, при этом моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу гуманизованного антитела, а молекула гуманизованного антитела выбрана из числа следующих:

HA-I: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35;

HA-II: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36;

HA-III: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38;

HA-IV: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, а переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36;

предпочтительно молекула гуманизованного антитела представляет собой HA-I.

6. Моноклональное антитело против TSLP или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 5, при этом молекула гуманизованного антитела также содержит константную область гуманизованного антитела.

7. Моноклональное антитело против TSLP или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 5 или 6, при этом молекула гуманизованного антитела представляет собой полноразмерное антитело или фрагмент антитела, причем молекула гуманизованного антитела включает один из фрагментов или комбинацию из Fab, F(ab)₂, Fv или scFv.

8. Моноклональное антитело против TSLP или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 4 или 6, при этом константная область гуманизованного антитела содержит константную область тяжелой цепи гуманизованного антитела и константную область легкой цепи гуманизованного антитела, причем константная область тяжелой цепи гуманизованного антитела выбрана из константной области тяжелой цепи человека типа IgG1, типа IgG2 или типа IgG4, а аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG1 приведена в SEQ ID NO: 30, аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG2 приведена в SEQ ID NO: 31, аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи типа IgG4 приведена в SEQ ID NO: 32, а константная область легкой цепи гуманизованного антитела представляет собой константную область легкой цепи человека типа C_κ, её аминокислотная последовательность приведена в SEQ ID NO: 33; и

предпочтительно константная область гуманизованного антитела содержит константную область тяжелой цепи человека типа IgG1 и константную область легкой цепи человека типа C_κ.

9. Белок, содержащий моноклональное антитело против TSLP или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8.

10. Молекула полинуклеотида, которая кодирует моноклональное антитело против TSLP или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8.

11. Вектор для экспрессии рекомбинантной ДНК, который содержит молекулу полинуклеотида по п. 10.

12. Клетка-хозяин, трансфицированная вектором для экспрессии рекомбинантной ДНК по п. 11, причем клетка-хозяин включает прокариотическую клетку, дрожжевую клетку, клетку насекомых или клетку млекопитающих; и

предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающих, и

клетка млекопитающих представляет собой клетку HEK293, клетку CHO или клетку NS0.

13. Лекарственное средство, которое содержит моноклональное антитело против TSLP или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8.

14. Применение моноклонального антитела против TSLP или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-8 при получении лекарственного средства для лечения иммунологического заболевания или рака;

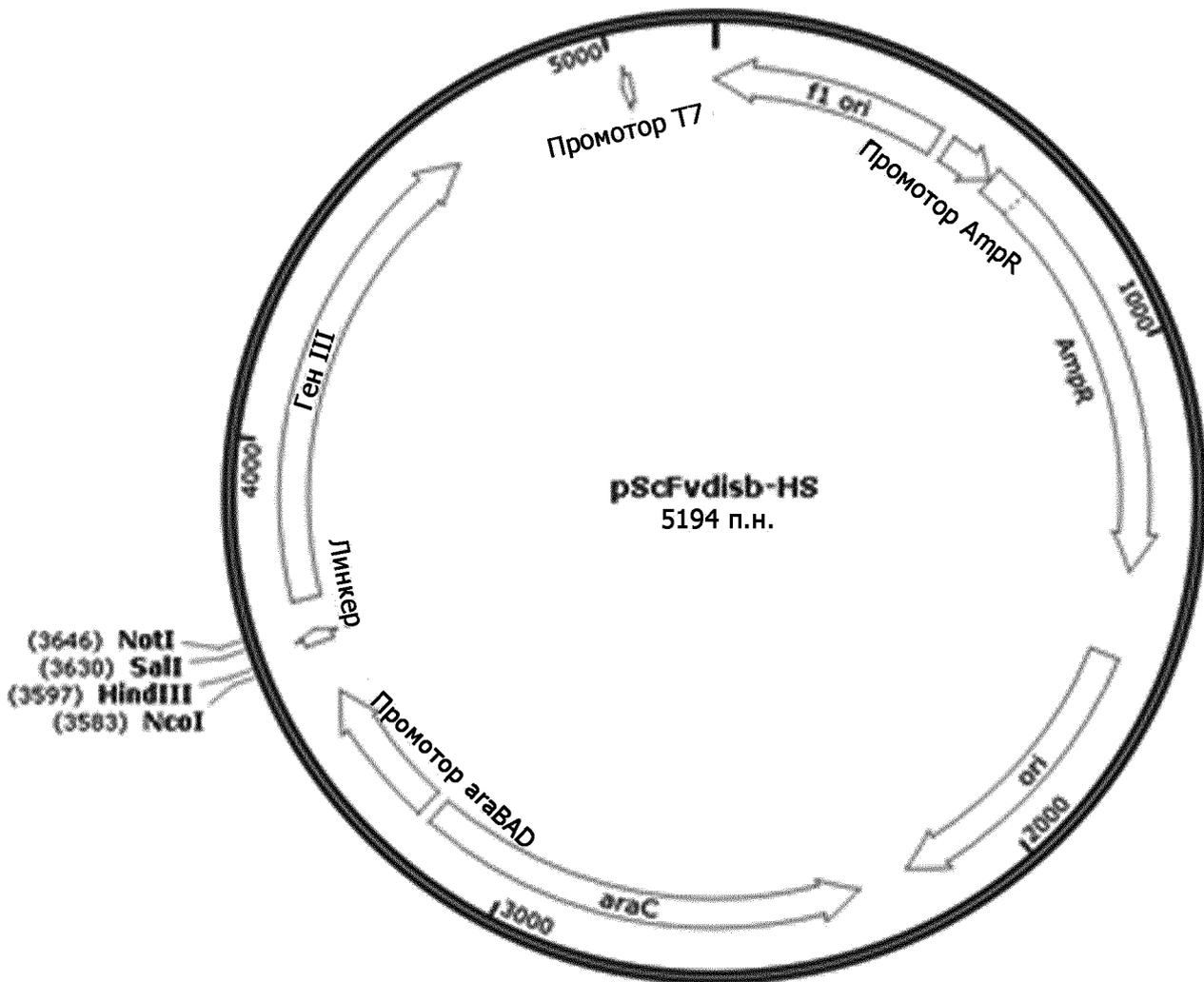
предпочтительно иммунологическое заболевание включает астму, хроническую обструктивную болезнь легких, хроническую эозинофильную пневмонию, идиопатический фиброз легких и аллергический дерматит; причем астма включают тяжелую астму, эозинофильную или неэозинофильную астму и слабоэозинофильную астму; и

предпочтительно рак включает рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легких, меланому, рак простаты, рак почек, колоректальный рак или рак молочной железы.

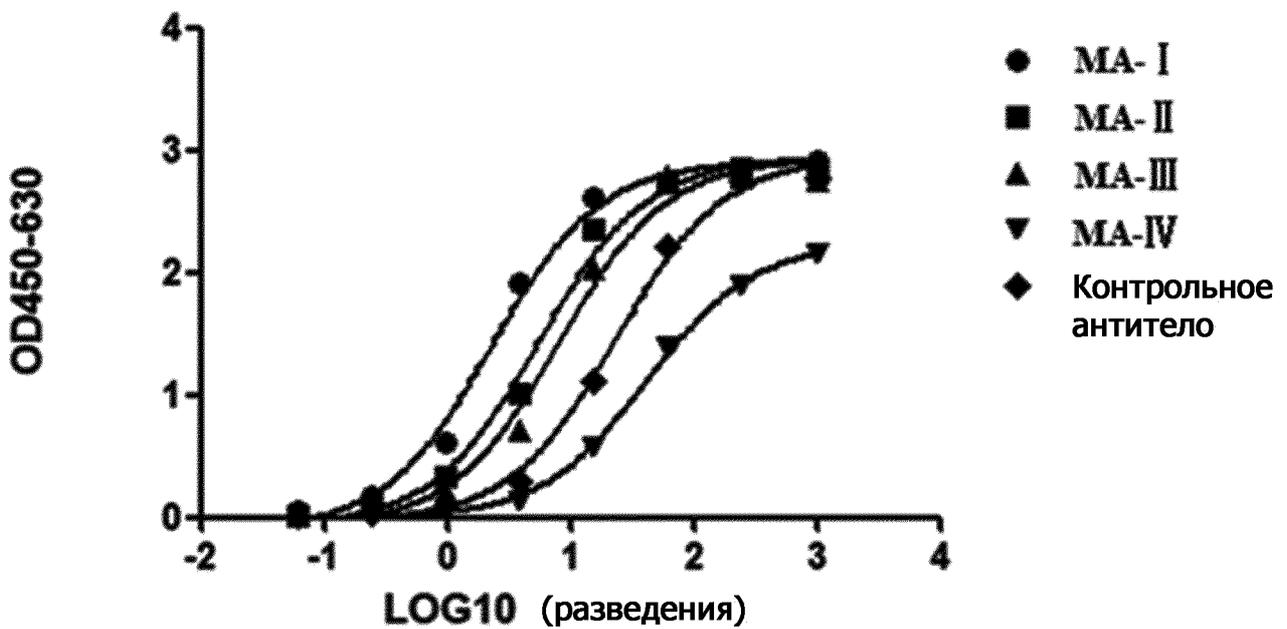
15. Способ лечения или профилактики заболевания, опосредованного TSLP, который включает введение терапевтически эффективного количества моноклонального антитела против TSLP по любому из пп. 1-8 нуждающемуся в этом лицу, а заболевание включает иммунологическое заболевание или рак;

иммунологическое заболевание включает астму, хроническую обструктивную болезнь легких, хроническую эозинофильную пневмонию, идиопатический фиброз легких и аллергический дерматит; причем астма включают тяжелую астму, эозинофильную или неэозинофильную астму и слабоэозинофильную астму; а

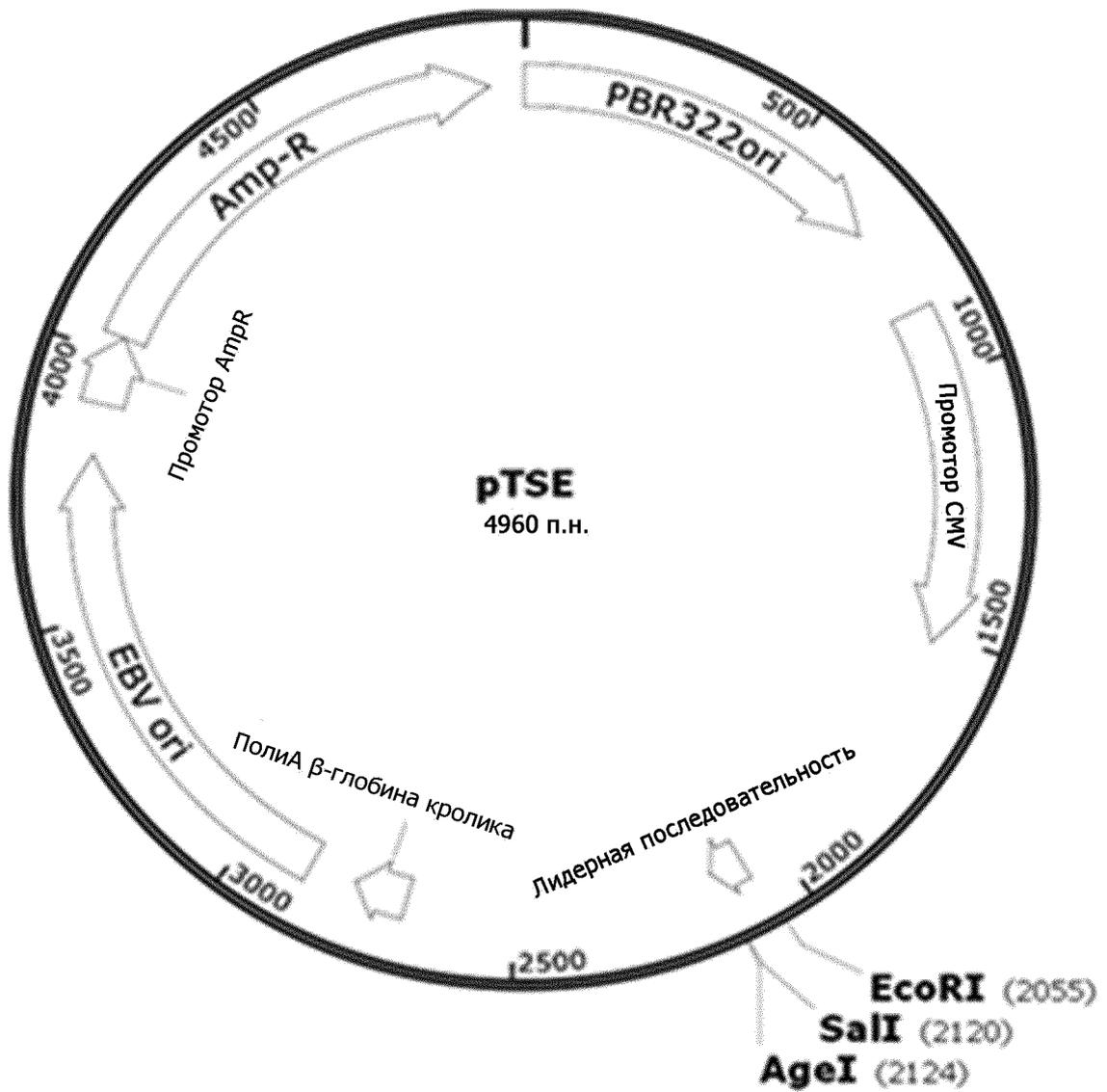
рак включает рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легких, меланому, рак простаты, рак почек, колоректальный рак или же рак молочной железы.



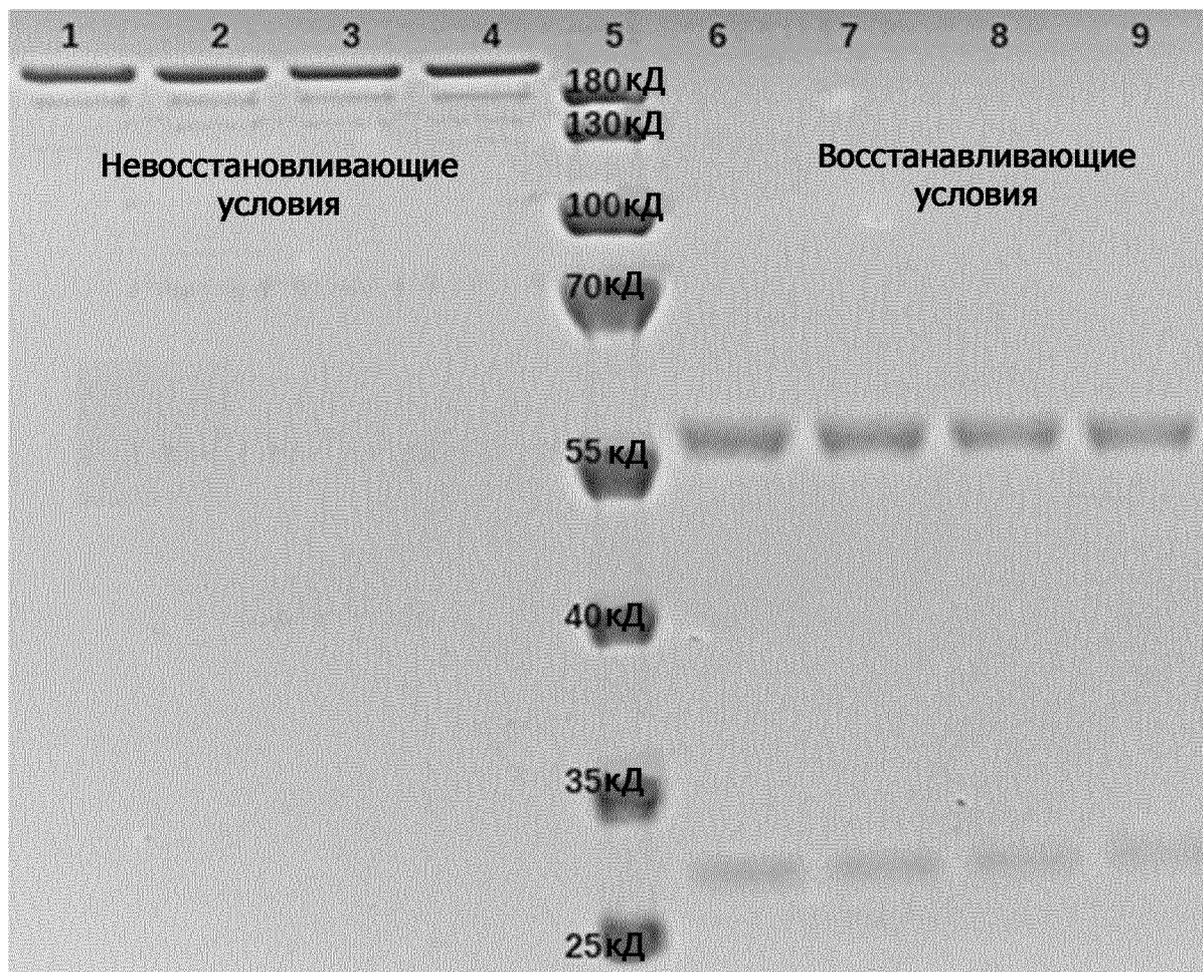
ФИГ. 1



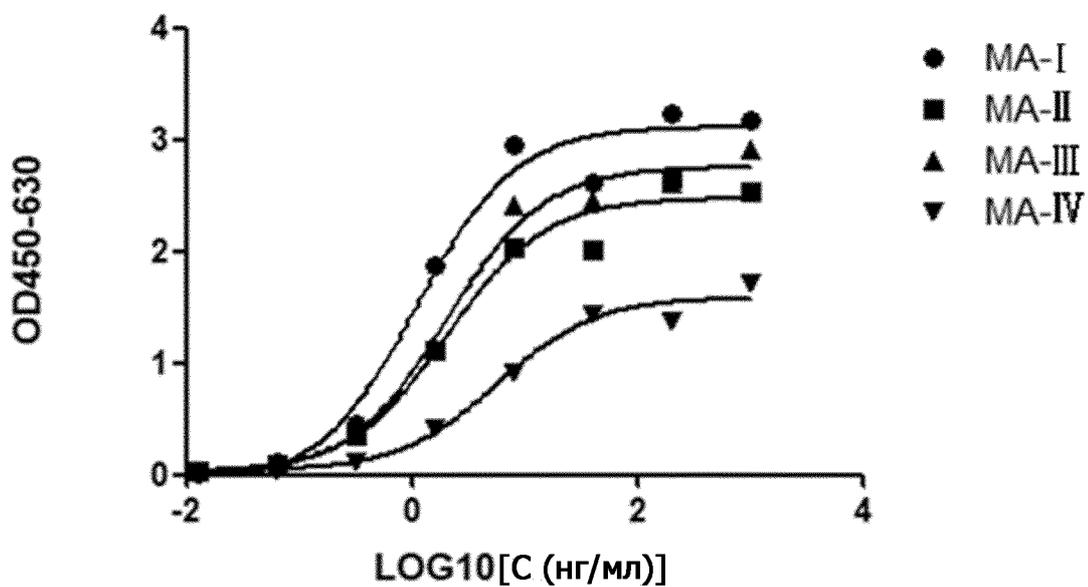
ФИГ. 2



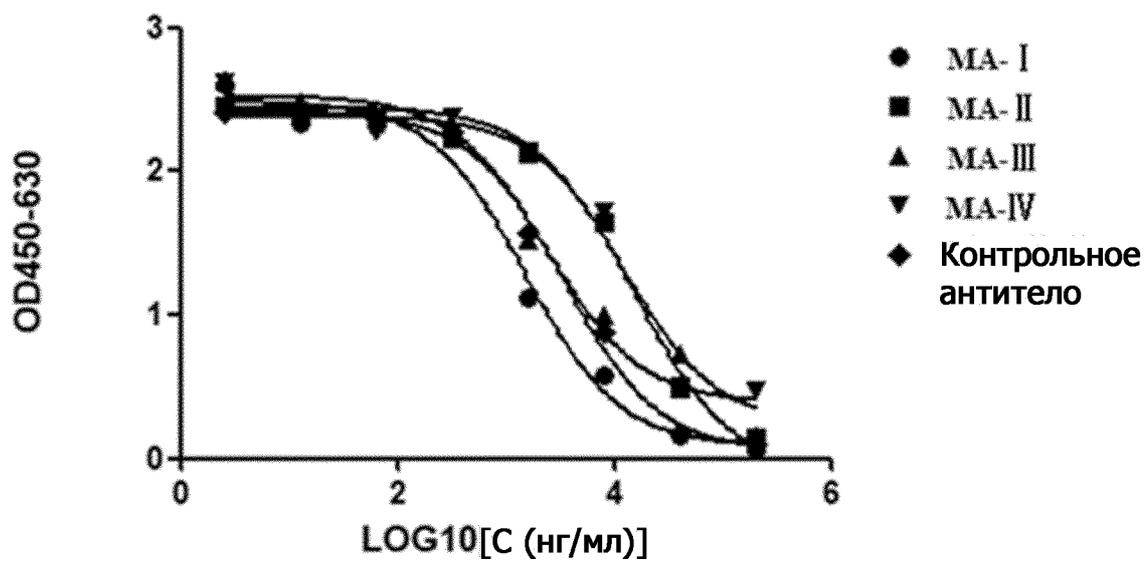
ФИГ. 3



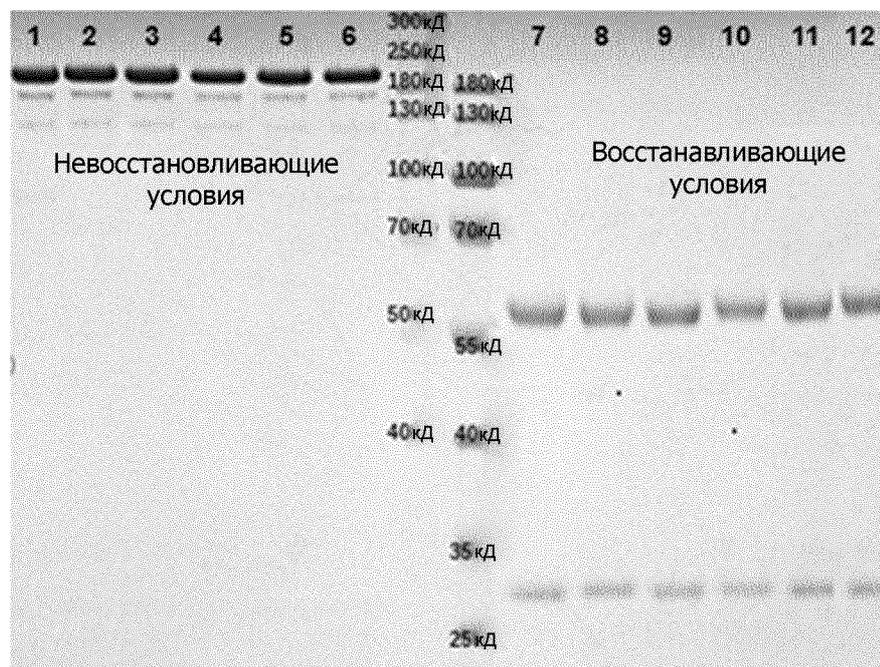
Фиг. 4



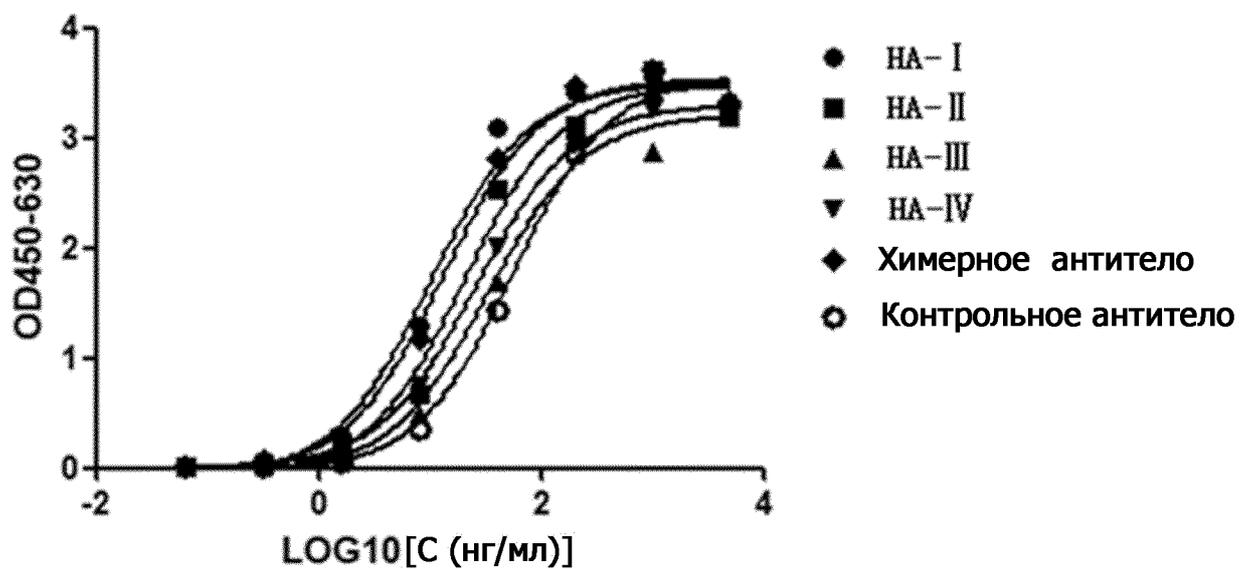
Фиг. 5



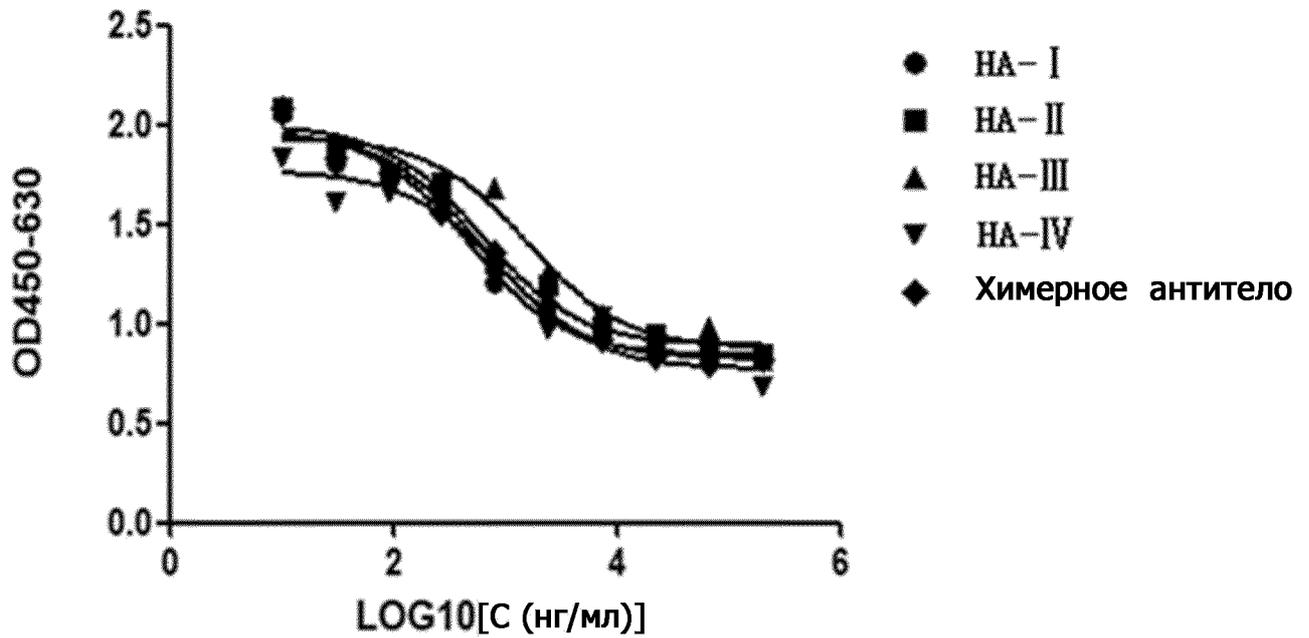
Фиг. 6



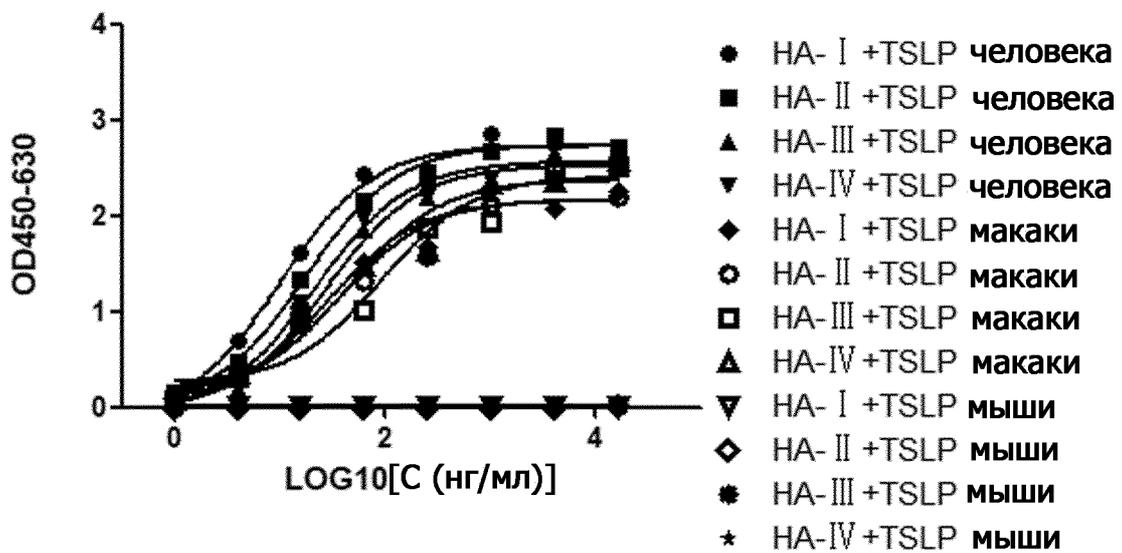
ФИГ. 7



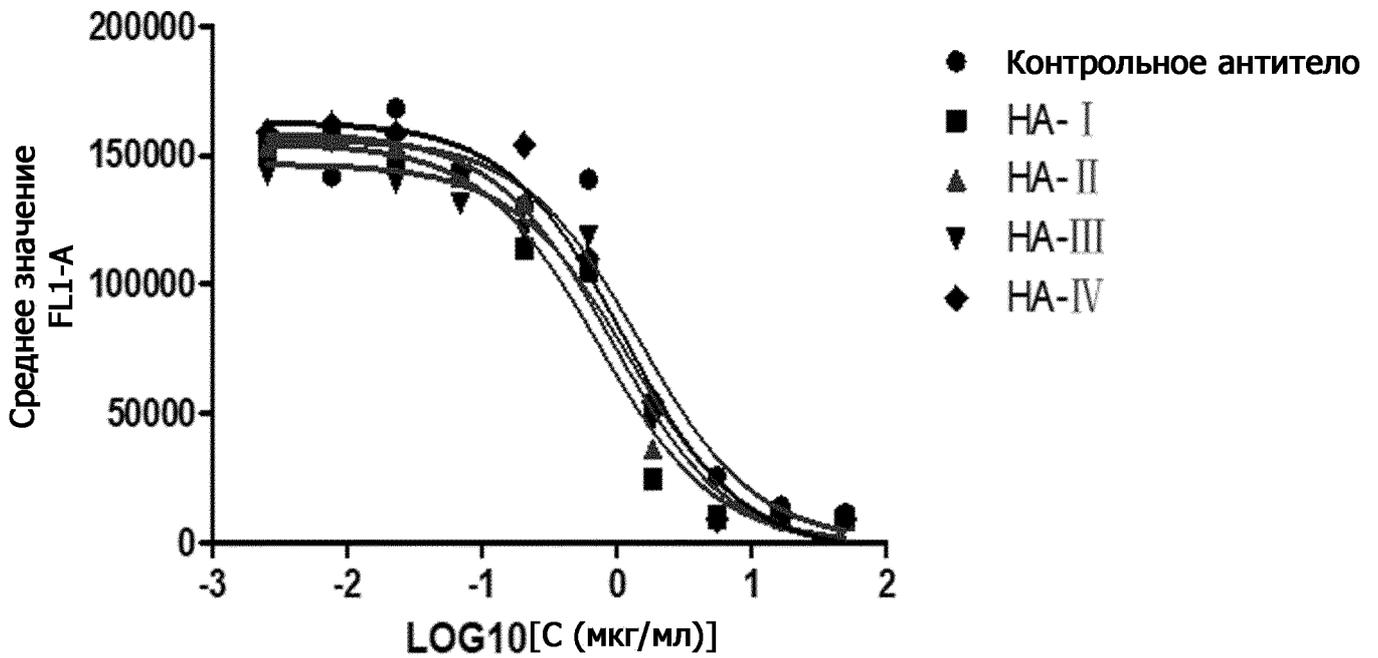
ФИГ. 8



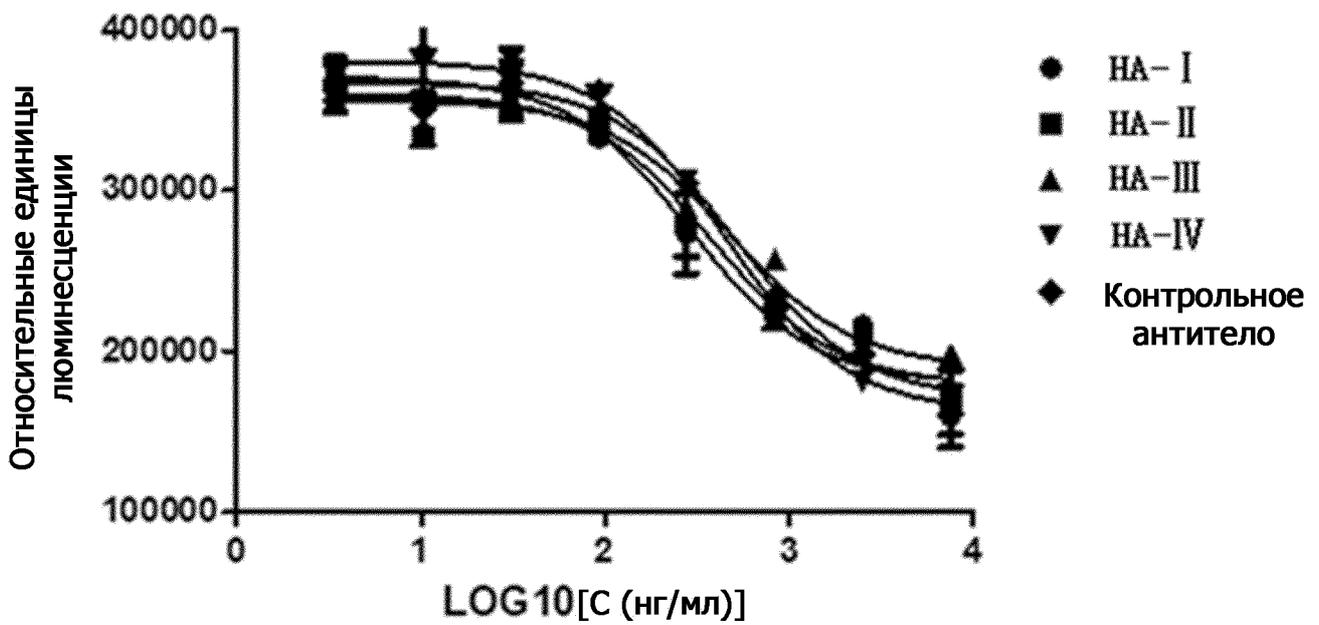
Фиг. 9



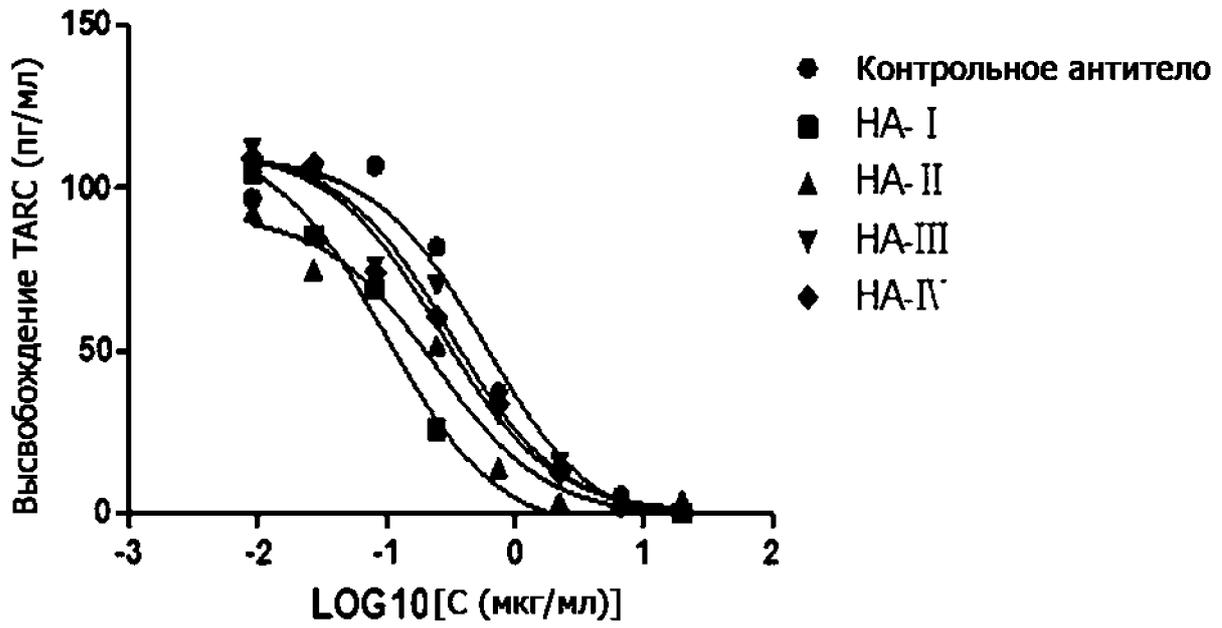
Фиг. 10



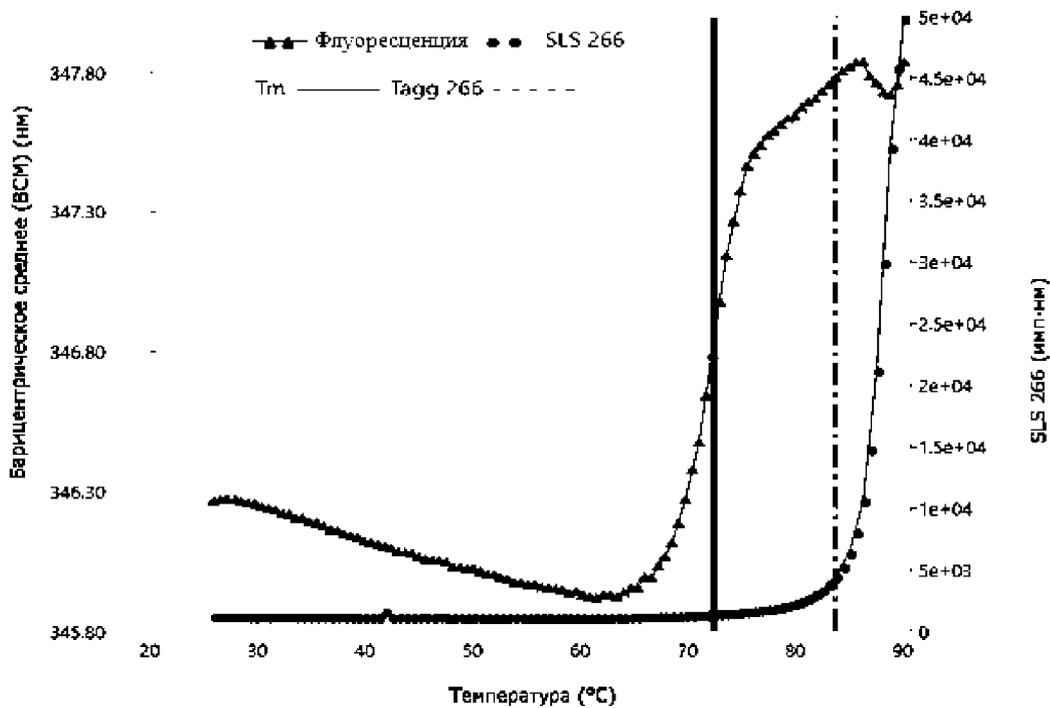
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14