



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 288 036**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C07K 14/475** (2006.01)

**C07K 16/22** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **99960372 .3**

(86) Fecha de presentación : **12.11.1999**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1129190**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2001**

(54) Título: **ADN de TSLP humano y polipéptidos.**

(30) Prioridad: **13.11.1998 US 108452 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.12.2007**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.12.2007**

(73) Titular/es: **IMMUNEX CORPORATION**  
**One Amgen Center Drive**  
**Thousand Oaks, California 91320-1799, US**

(72) Inventor/es: **Sims, John, E.;**  
**Lyman, Stewart;**  
**McKenna, Hilary y**  
**Armstrong, Allison**

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

## DESCRIPCIÓN

ADN de TSLP humano y polipéptidos.

## 5 Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Por medio de la presente esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos S.N. 60/108.452, presentada el 13 de noviembre de 1998.

## 10 Antecedentes de la invención

### Campo de la invención

15 La invención está dirigida a polipéptidos nuevos purificados y aislados de linfopoyetina estromal tímica humana y fragmentos de los mismos, a los ácidos nucleicos que codifican a tales polipéptidos, a los procesos para la producción de formas recombinantes de tales polipéptidos, a anticuerpos generados contra estos polipéptidos, a polipéptidos fragmentados derivados de estos polipéptidos, y a los usos de los mismos.

### Descripción del arte previo relacionado

20 Aunque se ha estudiado extensamente el desarrollo de células B, subsisten aún vacíos en las rutas que conducen desde las células madre hematopoyéticas hasta células B maduras. Se reconoce que las citoquinas influyen y juegan un papel crítico en el desarrollo y crecimiento de las células B. Las citoquinas conocidas que influyen en el desarrollo de las células B incluyen IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IFN-gama y al factor de estimulación de colonias de macrófago-granulocito (GM-CSF).

25 En años recientes, se ha demostrado que un nuevo factor de crecimiento murino, designado como linfopoyetina estromal tímica (TSLP), juega un papel en el desarrollo y maduración de las células B. La actividad de la citoquina de TSLP murina es muy similar a aquella de IL-7, que es requerida durante la proliferación y la supervivencia de las células pre-B (Janeway y colaboradores, *Immuno Biology*, 2nd Ed. (1996)). Se ha demostrado que estas dos citoquinas mantienen a las células NAG8/7 (Friend y colaboradores, *Exp. Hematol.*, 22:321-328 (1994)) y soportan la limfopoyesis de B. Además, los linfocitos B maduros fallan en desarrollarse en ausencia ya sea de IL-7 o de TSLP murina. Además, se ha demostrado que la TSLP murina puede remplazar a la IL-7 en el mantenimiento de las respuestas proliferativas de las células B (Ray y colaboradores, *Eur. J. Immunol.*, 26:10-16 (1996)). Por lo tanto, en el sistema del ratón, TSLP tiene una función significativa en el desarrollo de las células B.

30 Como al IL-7, la TSLP murina puede coestimular también a los timocitos y a las células T maduras (Friend y colaboradores, *Exp. Hematol.*, 22:321-328 (1994)). Los estudios con ratones con el receptor de IL-7 desactivado genéticamente (IL-7R) indican que IL-7, TSLP, o ambos juegan un papel crucial en el control del reordenamiento del locus del receptor gama de células T (TCR $\gamma$ ), presumiblemente por medio de accesibilidad mediada de los genes TCR $\gamma$  a la recombinasa VDJ (Candeias y colaboradores, *Immunology Letters*, 57:9-14 (1997)). Por lo tanto, la TSLP murina también juega un papel significativo en el desarrollo de las células T.

35 Los receptores de TSLP murina y los receptores de IL-7 usan ambos a la cadena  $\alpha$  de IL-7R como parte de sus complejos de señalamiento (Levin y colaboradores, *J. Immunol.*, 162:677-683 (1999)). A pesar de la cadena  $\alpha$  común de IL-7R, sin embargo, parece que IL-7 y TSLP median sus efectos linfopoyéticos a través de distintos mecanismos. IL-7 induce la activación de Stat5 y a las quinasas de la familia Janus Jak1 y Jak3, mientras que la TSLP murina induce la activación de Stat5, pero a ninguna de las quinasas conocidas de la familia Janus (Levin y colaboradores, *J. Immunol.*, 162:677-683 (1999)).

40 Dada la importante función de TSLP murina y el significado de su papel en el desarrollo y la maduración de las células B y de las células T en el sistema del ratón, existe la necesidad en el estado del arte de identificar y aislar la TSLP humana y de estudiar su papel en el desarrollo y la maduración de las células B y de las células T humanas. Además, en vista del continuo interés en el desarrollo de linfocitos y en el sistema inmune, el descubrimiento, identificación y el papel de nuevas proteínas, tales como la TSLP humana y sus receptores, están en primera línea de la biología molecular moderna, la bioquímica y la inmunología. A pesar del aumento en el conocimiento, todavía existe la necesidad en el estado del arte por conocer la identidad y la función de las proteínas involucradas en las respuestas celulares e inmunológicas.

45 En otro aspecto, la identificación de la estructura primaria, o secuencia, de una proteína desconocida es la culminación de un arduo proceso de experimentación. Con el propósito de identificar una proteína desconocida, el investigador puede confiar en una comparación de la proteína desconocida con péptidos conocidos utilizando una variedad de técnicas conocidas por aquellos capacitados en el arte. Por ejemplo, se analizan rutinariamente proteínas utilizando técnicas tales como electroforesis, sedimentación, cromatografía, secuenciación y espectrometría de masas.

50 En particular, la comparación de una proteína desconocida con polipéptidos de peso molecular conocido permite una determinación del peso molecular aparente de la proteína desconocida (T.D. Brock y M.T. Madigan, *Biology of Microorganisms*, páginas 76-77, Prentice Hall, 6ª edición, (1991)). Los estándares de peso molecular de proteína se

encuentran comercialmente disponibles para ayudar a la estimación de los pesos moleculares de proteínas desconocidas (New England Biolabs Inc. Catalog: 130-13 (1995)); (J. L. Hartley, patente estadounidense No. 5.449.758). Sin embargo, los estándares de peso molecular puede que no correspondan lo suficientemente en tamaño con la proteína desconocida para permitir una estimación precisa del peso molecular aparente. La dificultad en la estimación del peso molecular es compuesta en el caso de proteínas que están sometidas a fragmentación por medios químicos o enzimáticos, modificada por la modificación o el procesamiento postraducciona, y/o asociada con otras proteínas en complejos no covalentes.

Además, la naturaleza única de la composición de una proteína con relación a sus constituyentes aminoácidos específicos resulta en un posicionamiento único de los sitios de escisión dentro de la proteína. La fragmentación específica de una proteína por medio de escisión química o enzimática resulta en una "huella única del péptido" (D. W. Cleveland y colaboradores, J. Biol. Chem. 252: 1102-1106 (1977); M. Brown y colaboradores, J. Gen. Virol. 50:309-316 (1980)). Por consiguiente, la escisión en sitios específicos resulta en una fragmentación reproducible de una proteína dada en péptidos de pesos moleculares precisos. Además, estos péptidos poseen una carga única característica que determina el pH isoelectrico del péptido. Estas características únicas se pueden explotar utilizando una variedad de técnicas electroforéticas y de otra índole (T.D. Brock y M.T. Madigan, Biology of Microorganisms, páginas 76-77, Prentice Hall, 6ª edición. (1991)).

La fragmentación de proteínas se emplea además para el análisis de composición de aminoácidos y la secuenciación de proteínas (P. Matsudaira, J. Biol. Chem., 262:10035-10038 (1987); C. Eckerskorn y colaboradores, Electrophoresis, 9:830-838 (1988)), particularmente la producción de fragmentos de proteínas con un N terminal "bloqueado". Además, las proteínas fragmentadas pueden ser utilizadas para inmunización, por medio de selección por afinidad (R. A. Brown, patente estadounidense No. 5.151.412), para la determinación de los sitios de modificación (por ejemplo, fosforilación), para generación de compuestos biológicamente activos (T.D. Brock y M.T. Madigan, Biology of Microorganisms, 300-301 (Prentice Hall, 6ª edición, (1991)), y para diferenciación de proteínas homólogas (M. Brown y colaboradores, J. Gen. Virol., 50:309-316 (1980)).

Además, cuando se obtiene una huella digital de un péptido de una proteína desconocida, se puede comparar con una base de datos de proteínas conocidas para ayudar en la identificación de una proteína desconocida utilizando espectrometría de masas (W.J. Henzel y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5011-5015 (1993); D. Fenyo y colaboradores, Electrophoresis, 19:998-1005 (1998)). Una variedad de programas de computador para facilitar estas comparaciones se encuentran accesibles a través de Internet, tales como Protein Prospector (sitio en Internet: prospector.uscf.edu), Multident (sitio en Internet: www.expasy.ch/sprot/multiident.html), PeptideSearch (sitio en Internet: www.mann.embl-heidelberg.de...deSearch/FRPeptideSearch Form.html), y ProFound (sitio en Internet: www.chaitsg.rockefeller.edu/cgi-bin/protid-frag.html). Estos programas le permiten al usuario especificar el agente de escisión y los pesos moleculares de los péptidos fragmentados dentro de una tolerancia determinada. Los programas comparan estos pesos moleculares con la información del peso molecular de la proteína almacenada en las bases de datos para ayudar a determinar la identidad de la proteína desconocida. Se requiere una información precisa referente al número de péptidos fragmentados y al peso molecular preciso de esos péptidos para una identificación exacta. Por lo tanto, aumentando la precisión en la determinación del número de péptidos fragmentados y el peso molecular preciso debe dar como resultado una mayor probabilidad de éxito en la identificación de proteínas desconocidas.

Además, las digestiones de péptidos de proteínas desconocidas se pueden secuenciar utilizando espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y la secuencia resultante buscada contra las bases de datos (J.K. Eng, y colaboradores, J. Am. Soc. Mass Spec. 5:976-989 (1994); M. Mann y M. Wilm, Anal. Chem., 66:4390-4399 (1994); J.A. Taylor y R.S. Johnson, Rapid Comm. Mass Spec., 11:1067-1075 (1997)). Los programas de búsqueda que se pueden utilizar en este proceso se encuentran en la Internet, tales como LuteFisk 97 (sitio en Internet: www.lsb.com: 70/LuteFisk97.html), y los programas Protein Prospector, Peptide Search y ProFound descritos anteriormente. Por lo tanto, la adición de la secuencia de un gen y su secuencia proteínica predicha y los fragmentos del péptido a una base de datos de secuencia puede ayudar en la identificación de proteínas desconocidas utilizando espectrometría de masas en tándem.

De esta manera, existe también la necesidad en el estado del arte por péptidos adecuados para ser usados en los estudios de fragmentación de péptidos, para el uso en las mediciones de peso molecular, y para el uso en la secuenciación de proteínas utilizando espectrometría de masas en tándem.

## Resumen de la invención

La invención ayuda a satisfacer estas diferentes necesidades en el estado del arte proveyendo los ácidos nucleicos aislados de TSLP humana y los polipéptidos codificados por estos ácidos nucleicos. Las modalidades particulares de la invención están dirigidas a una molécula aislada de ácido nucleico de TSLP que contiene la secuencia de ADN de la SEQ ID NO: 1 y una molécula aislada de ácido nucleico de TSLP que codifica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, así como a las moléculas de ácido nucleico complementarias de esas secuencias. Tanto las moléculas de ácido nucleico de ARN y de ADN monocatenario como bicatenario son abarcadas por la invención, así como las moléculas de ácido nucleico que hibridan hasta un ADN bicatenario desnaturalizado que contiene el todo o parte de la SEQ ID NO: 1. También están incluidas las moléculas aisladas de ácido nucleico que se derivan por medio de mutagénesis *in vitro* de la molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1, que están degeneradas a partir de la molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia de la SEQ ID NO: 1, y que son variantes alélicas del ADN de la invención. La invención también abarca a los vectores recombinantes que dirigen

la expresión de estas moléculas de ácido nucleico y a las células huésped transformadas o transfectadas con estos vectores.

Además, la invención incluye métodos que se relacionan con el uso del ácido nucleico señalado anteriormente para identificar ácidos nucleicos que codifican a las proteínas que tienen la capacidad de inducir la proliferación de células de linaje B o de linaje T; para identificar al cromosoma humano número 5; para cartografiar genes sobre el cromosoma humano número 5; para identificar genes asociados con ciertas enfermedades, síndromes, u otras condiciones humanas asociadas con el cromosoma humano número 5; y para estudiar la señalización celular y al sistema inmunológico.

La invención también incluye el uso de oligonucleótidos sentido o antisentido del ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 para inhibir la expresión de los polinucleótidos codificados por el gen de TSLP.

La invención también incluye péptidos aislados y fragmentos de los mismos codificados por estas moléculas de ácido nucleico que incluyen porciones solubles de polipéptido de la SEQ ID NO: 2. La invención abarca además métodos para la producción de estos polipéptidos, incluido el cultivo de células huésped bajo condiciones que promuevan la expresión y recuperación del polipéptido del medio de cultivo. Especialmente, la expresión de estos polipéptidos en bacterias, levaduras, plantas, insectos y células de animales es abarcada por la invención.

En general, los polipéptidos de la invención pueden ser utilizados para estudiar procesos celulares tales como regulación inmunológica, proliferación celular, diferenciación celular, muerte celular, migración celular, interacción célula-célula, y respuestas inflamatorias. Además, estos polipéptidos se pueden utilizar para identificar proteínas asociadas con ligandos de TSLP y receptores de TSLP.

Además, la invención incluye ensayos que utilizan estos polipéptidos para seleccionar inhibidores potenciales de actividad asociados con moléculas de polipéptido de estructura contraria, y métodos de utilizar estos polipéptidos como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades mediadas por moléculas de polipéptido de TSLP de estructura contraria. Además, los métodos para utilizar estos polipéptidos en el diseño de inhibidores de los mismos son también un aspecto de la invención.

La invención incluye además un método para utilizar estos polipéptidos como marcadores de peso molecular que permiten la estimación del peso molecular de una proteína o de una proteína fragmentada, así como un método para la visualización de los marcadores de peso molecular de la invención de la misma utilizando electroforesis. La invención abarca además métodos para la utilización de los polipéptidos de la invención como marcadores para determinar el punto isoelectrónico de una proteína desconocida, así como controles para establecer el grado de fragmentación de una proteína.

Además, la invención incluye los kits para ayudar en estas determinaciones.

La invención abarca además el uso de las secuencias de ácido nucleico de TSLP humana, de las secuencias predichas de los aminoácidos del polipéptido o fragmento de las mismas, o una combinación de las secuencias predichas de los aminoácidos del polipéptido y fragmentos de los mismos para ser usadas en la búsqueda de una base de datos electrónica para ayudar en la identificación de ácidos nucleicos y/o proteínas de la muestra.

Los anticuerpos monoclonales o policlonales aislados que se enlazan a estos polipéptidos también son abarcados por la invención, así como el uso de estos anticuerpos para ayudar en la purificación del polipéptido de TSLP. Además, los anticuerpos aislados se pueden utilizar para establecer un Ensayo de Inmunoabsorción Enzimática (ELISA) para medir a la TSLP en muestras tales como el suero.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 presenta la secuencia de nucleótidos del ADN de TSLP humana (SEQ ID NO: 1), y

La Figura 2 presenta la secuencia de aminoácidos de TSLP humana (SEQ ID NO: 2).

### Descripción detallada de la invención

Las moléculas de ácido nucleico abarcadas por la invención incluyen la siguiente secuencia de nucleótidos:

Nombre: TSLP

```

1  GCAGCCAGAA AGCTCTGGAG CATCAGGGAG ACTCCAACCTT AAGGCAACAG
5  51  CATGGGTGAA TAAGGGCTTC CTGTGGACTG GCAATGAGAG GCAAAACCTG
   101  GTGCTTGAGC ACTGGCCCTT AAGGCAGGCC TTACAGATCT CTTACACTCG
   151  TGGTGGGAAG AGTTTAGTGT GAAACTGGGG TGGGAATTGGG TGTCCACGTA
   201  TGTTCCCTTT TGCCTTACTA TATGTTCTGT CAGTTTCTTT CAGGAAAATC
  10  251  TTCATCTTAC AACTTGTAGG GCTGGTGTTA ACTTACGACT TCACTAACTG
   301  TGACTTTGAG AAGATTAAAG CAGCCTATCT CAGTACTATT TCTAAAGACC
   351  TGATTACATA TATGAGTGGG ACCAAAAGTA CCGAGTTCAA CAACACCGTC
   401  TCTTGTAGCA ATCGGCCACA TTGCCTTACT GAAATCCAGA GCCTAACCTT
  15  451  CAATCCCACC GCCGGCTGCG CGTCGCTCGC CAAAGAAATG TTCGCCATGA
   501  AAATAAGGC TGCCTTAGCT ATCTGGTGCC CAGGCTATT CAGGAACTCAG
   551  ATAAATGCTA CTCAGGCAAT GAAGAAGAGG AGAAAAAGGA AAGTCACAAC
   601  CAATAAATGT CTGGAACAAG TGTCACAATT ACAAGGATTG TGGCGTCGCT
  20  651  TCAATCGACC TTTACTGAAA CAACAGTAAA CCATCTTTAT TATGGTCATA
   701  TTTCACAGCC CAAAATAAAT CATCTTTATT AAGTAAAAAA AAA
      (SEQ ID NO:1)

```

25 La secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos de la invención incluye:

Nombre: TSLP (polipéptido)

```

30  1  MFPFALLYVL SVSFRKIFIL QLVGLVLTID FTNCDFEKIK AAYLSTISKD
   51  LITYMSGTKS TEFNNTVSCS NRPHCLTEIQ SLTFNPTAGC ASLAKEMFAM
  101  RTKAALAIWC PGYSETQINA TQAMKKRRKR KVTNKCLEQ VSQQLGLWRR
  151  FNRPLLKQQ (SEQ ID NO:2)

```

35 El descubrimiento de los ácidos nucleicos de la invención permite la construcción de vectores de expresión que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos; células huésped transfectadas o transformadas con los vectores de expresión; polipéptidos biológicamente activos aislados y purificados y fragmentos de los mismos; el uso de ácidos nucleicos o de oligonucleótidos de los mismos como sondas para identificar ácidos nucleicos que codifican proteínas que tienen actividad como la de TSLP (por ejemplo, inducir la proliferación de células de linaje B o de linaje T), el uso de los ácidos nucleicos o de los oligonucleótidos de los mismos para identificar al cromosoma humano número 5; el uso de los ácidos nucleicos o de los oligonucleótidos de los mismos para cartografiar genes sobre el cromosoma humano número 5; el uso de los ácidos nucleicos o de los oligonucleótidos de los mismos para identificar genes asociados con ciertas enfermedades, síndromes u otras condiciones humanas asociadas con el cromosoma humano número 5 y, en particular, con la región q21-q22 del cromosoma número 5, incluido el síndrome de Gardner, poliposis coli adenomatosas, enfermedad desmoide hereditaria, síndrome de Turcot, y cáncer colorectal; el uso de oligonucleótidos monocatenarios sentido y antisentido de los ácidos nucleicos para inhibir la expresión de los polinucleótidos codificados por el de TSLP; el uso de tales polipéptidos y de fragmentos solubles para inducir la proliferación de células de linaje B o de linaje T; el uso de tales polipéptidos y péptidos fragmentados como marcadores de peso molecular; el uso de tales polipéptidos y péptidos fragmentados como controles para fragmentación de péptidos, y de los kits que contienen estos reactivos; el uso de tales polipéptidos y fragmentos de los mismos para generar anticuerpos; y el uso de los anticuerpos para purificar a los polipéptidos de TSLP.

Moléculas de ácido nucleico

55 En una modalidad particular, la invención se relaciona con ciertas secuencias aisladas de nucleótidos que están libres de material endógeno contaminante. Una "secuencia de nucleótidos" se refiere a una molécula de polinucleótido en la forma de un fragmento separado o como un componente de una construcción más grande de ácido nucleico. La molécula de ácido nucleico se ha derivado de ADN o ARN aislado al menos una vez en forma sustancialmente pura y en una cantidad o concentración que permite la identificación, manipulación y recuperación de sus secuencias nucleótidas componentes por medio de métodos bioquímicos estándar (tal como aquellos esbozados en (Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Tales secuencias son suministradas y/o construidas preferiblemente en la forma de un marco de lectura abierta no interrumpida por secuencias internas no traducidas, o intrones, que típicamente están presentes en genes de eucariotas. Las secuencias de ADN no traducido pueden estar presentes 5' ó 3' a partir de un marco de lectura abierta, donde el mismo no interfiere con la manipulación o la expresión de la región de codificación.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen ADN tanto en forma monocatenaria como bicatenaria, así como el complemento de ARN del mismo, el ADN incluye, por ejemplo, ADNc, ADN genómico, ADN sintetizado químicamente, ADN amplificado por medio de PCR, y combinaciones de los mismos. El ADN genómico se puede aislar por medio de técnicas convencionales, por ejemplo, utilizando el ADNc de la SEQ ID NO: 1, o un fragmento adecuado del mismo, como una sonda.

Las moléculas de ADN de la invención incluyen genes de longitud completa así como polinucleótidos y fragmentos de los mismos. El gen de longitud completa puede incluir también al péptido señal N-terminal. Otras modalidades incluyen ADN que codifica una forma soluble, por ejemplo, que codifica al dominio extracelular de la proteína, ya sea con o sin el péptido señal.

Los ácidos nucleicos de la invención se derivan preferencialmente de fuentes humanas, pero la invención incluye también a aquellos derivados de especies no humanas.

#### 15 *Secuencias Preferidas*

La secuencia de nucleótidos particularmente preferida de la invención es la SEQ ID NO: 1, como se expuso anteriormente. Se aisló un clon de ADNc que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 como se describe en el Ejemplo 1. La secuencia de aminoácidos codificada por el ADN de la SEQ ID NO: 1 se muestra en la SEQ ID NO: 2. Esta secuencia identifica al polinucleótido de TSLP como miembro de un grupo de factores que influyen el crecimiento de células de linaje B y de linaje T (Ray y colaboradores, Eur. J. Immunol, 26:10-16 (1996)); (Friend y colaboradores, Exp. Hematol., 22:321-328 (1994)).

#### 25 *Secuencias Adicionales*

Debido a la degeneración conocida del código genético, en donde más de un codón puede codificar al mismo aminoácido, una secuencia de ADN puede variar de aquella mostrada en la SEQ ID NO: 1, y codificar aún a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. Tales secuencias de variantes de ADN pueden resultar de mutaciones silenciosas (por ejemplo, que ocurren durante la amplificación por PCR), o pueden ser el producto de mutagénesis deliberada de una secuencia nativa.

La invención provee así secuencias aisladas de ADN que codifican polipéptidos de la invención, seleccionadas de: (a) ADN que contiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1; (b) ADN que codifica al polipéptido de la SEQ ID NO: 2; (c) ADN capaz de hibridación de un ADN de (a) o (b) bajo condiciones restrictivas moderadas y que codifican polipéptidos de la invención; (d) ADN capaz de hibridación hasta un ADN de (a) o (b) bajo condiciones altamente restrictivas y que codifican polipéptidos de la invención, y (e) ADN que está degenerado como resultado del código genético para un ADN definido en (a), (b), (c), o de (d) y que codifican polipéptidos de la invención. Desde luego, los polipéptidos codificados por tales secuencias de ADN son abarcados por la invención.

Como se las utiliza aquí, las condiciones restrictivas moderadas las pueden determinar fácilmente aquellos ordinariamente capacitados en la técnica con base en, por ejemplo, la longitud del ADN. Las condiciones básicas son expuestas por (Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición. Vol. 1, páginas 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)), e incluyen el uso de una solución de prelavado para los filtros de nitrocelulosa 5X SSC, 0,5% de SDS, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), condiciones de hibridación aproximadamente del 50% de formamida, 6X SSC aproximadamente a 42°C (u otra solución similar de hibridación, tal como la solución de Stark, en aproximadamente 50% de formamida, aproximadamente a 42°C), y condiciones de lavado aproximadamente 60°C, 0,5X SSC, 0,1% de SDS. Las condiciones restrictivas altas las puede determinar también fácilmente el operario capacitado con base en, por ejemplo, la longitud del ADN. Generalmente, tales condiciones se definen como condiciones de hibridación como anteriormente, y con lavado aproximadamente a 68°C, 0,2X SSC, 0,1% de SDS. El operario capacitado reconocerá que la temperatura y la concentración salina de la solución de lavado se pueden ajustar según se necesite de acuerdo a factores tales como la longitud de la sonda.

También está incluida como una modalidad de la invención el ADN que codifica fragmentos de polipéptido y polipéptidos que contienen un sitio(s) inactivado(s) de N-glicosilación, sitio(s) inactivado(s) de procesamiento de proteasa, o sustitución(es) conservadora(s) de aminoácidos, como se describe más adelante.

En otra modalidad, las moléculas de ácido nucleico de la invención también comprenden secuencias de nucleótidos que son al menos 80% idénticas a una secuencia nativa. También se contemplan modalidades en las cuales una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia que es al menos 90% idéntica, al menos 95% idéntica, al menos 98% idéntica, al menos 99% idéntica, o al menos 99,9% idéntica a una secuencia nativa.

El porcentaje de identidad se puede determinar por medio de inspección visual y de cálculo matemático. Alternativamente, el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico se puede determinar por medio de la comparación de la información de la secuencia utilizando el programa de computador GAP, versión 6.0 descrita por (Devereux y colaboradores, Nucl. Acids Res., 12:387 (1984)) y disponible con el University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGC). Los parámetros preferidos por defecto para el programa GAP incluyen: (1) una matriz unitaria de comparación (que contienen un valor de 1 para las identidades y de 0 para la falta de identidad) para los nucleótidos, y la matriz de comparación ponderada de (Gribskov y Burgess, Nucl. Acids Res., 14:6745 (1986)), como

lo describen (Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, páginas 353-358 (1979)); (2) una penalización de 3,0 por cada vacío y una penalización adicional de 0,10 por cada símbolo en cada vacío; y (3) ninguna penalización para los vacíos terminales. Alguien capacitado en la técnica puede utilizar también otros programas de comparación de secuencia.

5

La invención también provee ácidos nucleicos aislados útiles en la producción de polipéptidos. Tales polipéptidos se pueden preparar por medio de cualquier cantidad de técnicas convencionales. Una secuencia de ADN que codifica a un polipéptido de TSLP humana, o un fragmento deseado de la misma se pueden subclonar dentro de un vector de expresión para la producción del polipéptido o del fragmento. La secuencia de ADN convenientemente se fusiona a una secuencia que codifica a un péptido señal o líder adecuado. Alternativamente, el fragmento deseado puede ser sintetizado químicamente utilizando técnicas conocidas. Los fragmentos de ADN también pueden ser producidos por medio de digestión con una endonucleasa de restricción de una secuencia de ADN clonada de longitud completa, y aislada por medio de electroforesis sobre geles de agarosa. Si es necesario, los oligonucleótidos que reconstruyen al terminal 5' ó 3' hasta un punto deseado se pueden ligar a un fragmento de ADN generado por medio de la digestión con una enzima de restricción. Tales oligonucleótidos pueden contener adicionalmente un sitio de escisión para la endonucleasa de restricción secuencia arriba de la secuencia de codificación deseada, y posicionar un codón de iniciación (ATG) en el N-terminal de la secuencia de codificación.

También se puede emplear el procedimiento conocido de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para aislar y amplificar una secuencia de ADN que codifica a un fragmento deseado de proteína. Los oligonucleótidos que definen a los terminales deseados del fragmento de ADN se emplean como iniciadores 5' y 3'. Los oligonucleótidos pueden adicionalmente contener sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción, para facilitar la inserción del fragmento amplificado de ADN dentro de un vector de expresión. Las técnicas de PCR son descritas en (Saiki y colaboradores, Science, 239:487 (1988)); (Wu y colaboradores, Recombinant DNA Methodology, eds., Academic Press, Inc., San Diego, pp. 189-196 (1989)); y (Innis y colaboradores, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds., Academia Press, Inc. (1990)).

#### *Polipéptidos y fragmentos de los mismos*

La invención abarca polipéptidos y fragmentos de los mismos en diferentes formas, incluidas aquellas de ocurrencia natural o producidas a través de diferentes técnicas tales como procedimientos que involucran tecnología de ADN recombinante. Tales formas incluyen, pero no se limitan a, derivados, variantes y oligómeros, así como proteínas de fusión o fragmentos de las mismas.

#### *Polipéptidos y Fragmentos de los Mismos*

Los polipéptidos de la invención incluyen proteínas de longitud completa codificadas por las secuencias de ácido nucleico expuestas anteriormente. Los polipéptidos particularmente preferidos comprenden a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 con fragmentos particularmente preferidos que comprenden a los aminoácidos 29 a 159 (la secuencia madura de polipéptido) de la SEQ ID NO: 2.

El polipéptido de la SEQ ID NO: 2 incluye una región N-terminal hidrófoba que funciona como un péptido señal. El análisis por computador predice que el péptido señal corresponde a los residuos 1 a 28 de la SEQ ID NO: 2 (aunque los siguientes sitios de escisión del péptido señal predichos por computador se presentan más probablemente (en orden descendiente) después de los aminoácidos 34 a 116 de la SEQ ID NO: 2). La escisión del péptido señal produciría así una proteína madura que contiene a los aminoácidos 29 a 159 de la SEQ ID NO: 2.

El operario capacitado reconocerá que los límites descritos anteriormente de tales regiones del polipéptido son aproximados. Para ilustración, los límites del péptido señal (que pueden ser predichos por medio de la utilización de programas de computador disponibles para ese propósito) pueden digerir de aquellos descritos anteriormente.

Los polipéptidos de la invención pueden ser unidos a la membrana o pueden ser segregados y de este modo ser solubles. Los polipéptidos solubles pueden ser segregados a partir de las células en las cuales ellos se expresan. En general, los polipéptidos solubles se pueden identificar (y distinguirse de las contrapartes no solubles unidas a la membrana) por medio de la separación de las células intactas que expresan al polipéptido deseada a partir del medio de cultivo, por ejemplo, por medio de centrifugación, y ensayado el medio (sobrenadante) por la presencia del polipéptido deseado. La presencia del polipéptido en el medio indica que el polipéptido fue segregado de las células y de esta manera es una forma soluble de la proteína.

En una modalidad, los polipéptidos solubles y los fragmentos de los mismos contienen todo o parte del dominio extracelular, pero carecen de la región transmembrana que causaría la retención del polipéptido sobre una membrana celular. Un polipéptido soluble puede incluir al dominio citoplasmático, o una porción del mismo, mientras que el polipéptido es segregado de la célula en la cual se produce.

Otras modalidades incluyen fragmentos solubles que tienen un N-terminal en los aminoácidos 29 ó 35 y un C-terminal en el aminoácido 159.

En general, el uso de formas solubles es conveniente para ciertas aplicaciones. La purificación de los polipéptidos a partir de células huésped recombinantes se facilita, ya que los polipéptidos solubles se segregan a partir de las células. Además, los polipéptidos solubles son generalmente más adecuados para administración intravenosa.

La invención también provee polipéptidos y fragmentos del dominio extracelular que retienen una actividad biológica deseada. Las modalidades particulares están dirigidas a los fragmentos de polipéptido que retiene la habilidad de unirse a los receptores de TSLP. Tal fragmento puede ser un polipéptido soluble, como se describió anteriormente. En otra modalidad, los polipéptidos y los fragmentos incluyen convenientemente regiones que están conservadas entre la familia de proteínas que influyen sobre el crecimiento de las células de linaje B o de linaje T descritas anteriormente.

También se proveen aquí fragmentos de polipéptido que contiene al menos 20, o al menos 30, aminoácidos contiguos de la secuencia de la SEQ ID NO: 2. Los fragmentos derivados del dominio citoplasmático encuentran uso en estudios de transducción de señal, y en procesos de regulación celular asociados con la transducción de señales biológicas. También se pueden emplear fragmentos de polipéptido como inmunógenos, en la generación de anticuerpos.

#### *Variantes*

Se proveen aquí las variantes de ocurrencia natural así como las variantes derivadas de los polipéptidos y de los fragmentos.

Las variantes pueden exhibir secuencias de aminoácidos que son al menos 80% idénticas. También se contemplan modalidades en las cuales un polipéptido o fragmento comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica, al menos 95% idéntica, al menos 98% idéntica, al menos 99% idéntica, o al menos 99,9% idéntica al polipéptido preferido o fragmento del mismo. El porcentaje de identidad se puede determinar por medio de inspección visual y de cálculos matemáticos. Alternativamente, el porcentaje de identidad de dos secuencias de proteína se puede determinar por medio de la comparación de la información de la secuencia utilizando el programa de computador GAP, con base en los algoritmos de (Needleman y Wunsch, J. Mol. Bio., 48:443 (1970)) y disponible con el University of Wisconsin Genetics Computer Group (LJWGCG). Los parámetros preferidos por defecto por el programa GAP incluyen: (1) una matriz de conteo, blosum62, como lo describen (Henikoff y Henikoff Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915 (1992)); (2) un peso vacío de 12; (3) un peso de longitud vacía de 4; y (4) ninguna penalización por vacíos en los extremos. Se pueden emplear otros programas para que sean utilizados por una persona capacitada en el arte de comparación de secuencias.

Las variantes de la invención incluyen, por ejemplo, aquellas que resultan de eventos alternos de empalme de ARNm o de escisión proteolítica. El empalme alternativo de ARNm puede, por ejemplo, producir una proteína truncada pero biológicamente activa, tal como una forma soluble de ocurrencia natural de la proteína. Las variaciones atribuibles a la proteólisis incluyen, por ejemplo, diferencias en el N-terminal o en el C-terminal por la expresión en diferentes tipos de células huésped, debido a la remoción proteolítica de uno o más aminoácidos terminales de la proteína (generalmente entre los aminoácidos 1-5 terminales). Las proteínas en las cuales las diferencias en la secuencia de aminoácidos son atribuibles a polimorfismo genético (variación alélica entre individuos que producen la proteína) también se contemplan aquí.

Las variantes adicionales dentro del alcance de la invención incluyen polipéptidos que se pueden modificar para crear derivados de los mismos por medio de la formación de conjugados covalentes o de agregación con otras fracciones químicas, tales como grupos glicosilo, lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares. Los derivados covalentes se pueden preparar por medio del enlazamiento de fracciones químicas con grupos funcionales sobre cadenas laterales de aminoácidos o en el N-terminal o en el C-terminal de un polipéptido. Los conjugados que contienen agentes de diagnóstico (detectables) o agentes terapéuticos unidos a ellos son contemplados aquí, como se discute con más detalle más adelante.

Otros derivados incluyen conjugados covalentes o de agregación de los polipéptidos con otras proteínas o polipéptidos, tal como por medio de síntesis en un cultivo recombinante como fusiones N-terminales o C-terminales. Ejemplo de proteínas de fusión se discuten más adelante en conexión con los oligómeros. Además, las proteínas de fusión pueden contener péptidos añadidos para facilitar la purificación y la identificación. Tales péptidos incluyen, por ejemplo, poli-His o los péptidos de identificación antigénica descritos en la patente estadounidense No. 5.011.912 y en (Hopp y colaboradores, Biol. Technology, 6:1204 (1988)). Un péptido así es el péptido FLAG®, Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys, (SEQ ID NO: 3) que es altamente antigénico y provee un epítipo reversiblemente enlazado por medio de un anticuerpo monoclonal específico, que permite un ensayo rápido y facilita la purificación de la proteína recombinante expresada. Un hibridoma murino designado como 4E1 produce un anticuerpo monoclonal que se enlaza al péptido FLAG® en presencia de ciertos cationes metálicos divalentes, como se describe en la patente estadounidense No. 5.011.912. La línea celular del hibridoma 4E11 ha sido depositada en la American Type Culture Collection con el número de acceso No. HB 9259. Los anticuerpos monoclonales que se enlazan al péptido FLAG® se encuentran disponibles con Eastman Kodak Co., Scientific Imaging Systems División, New Haven, Connecticut.

Entre las variantes de polipéptidos suministradas aquí están las variantes de polipéptidos nativos que retienen la actividad biológica nativa o el equivalente sustancial de la misma. Un ejemplo es una variante que se enlaza esencialmente con la misma afinidad de enlazamiento con la que la hace la forma nativa. La afinidad de enlazamiento se puede

medir por medio de procedimientos convencionales, por ejemplo como se describe en la patente estadounidense No. 5.512.457 y que se expone más adelante.

Las variantes incluyen polipéptidos que son sustancialmente homólogos a la forma nativa, pero que tienen una secuencia de aminoácidos diferente de aquella de la forma nativa debido a una o más supresiones, inserciones o sustituciones. Las modalidades particulares incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos que contienen de una a diez supresiones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos, cuando se las compara con una secuencia nativa.

Un aminoácido dado se puede remplazar, por ejemplo, por un residuo que tiene características fisicoquímicas similares. Los ejemplos de tales sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo alifático por otro, tal como Ile, Val, Leu, o Ala por otro; las sustituciones de un residuo polar por otro, tal como entre Lys y Arg, Glu y Asp, o Gln y Asn; o sustituciones de un residuo aromático por otro, tal como Phe, Trp o Tyr por otro. Otras sustituciones conservadoras, por ejemplo que involucran sustituciones de regiones enteras que tiene características hidrófobas similares, son bien conocidas.

En forma similar, los ADN de la invención incluyen variantes que difieren de una secuencia nativa de ADN debido a una o más supresiones, inserciones o sustituciones, pero que codifican a un polipéptido biológicamente activo.

La invención incluye además a los polipéptidos de la invención con o sin glicosilación asociada a un patrón nativo. Los polipéptidos expresados en sistemas de expresión de levadura o de mamífero (por ejemplo, células COS-1 o COS-7) pueden ser similares a, o significativamente diferentes de un polipéptido nativo en peso molecular y en el patrón de glicosilación, dependiendo del sistema de expresión escogido. La expresión de los polipéptidos de la invención en sistemas de expresión bacteriana, tales como *E. coli*, proveen moléculas no glicosiladas. Además, una preparación dada puede incluir múltiples especies diferencialmente glicosiladas de la proteína. Los grupos glicosilo se pueden remover a través de métodos convencionales, en particular aquellos que utilizan glicopeptidasa. En general, los polipéptidos glicosilados de la invención se pueden incubar con un exceso molar de glicopeptidasa (Boehringer Mannheim).

En la misma medida, construcciones similares de ADN que codifican diferentes adiciones o sustituciones de residuos de aminoácidos o de secuencias, o supresiones de residuos terminales o internos o de secuencias son abarcadas por la invención. Por ejemplo, los sitios de N-glicosilación en el dominio extracelular del polipéptido se pueden modificar para impedir la glicosilación, permitiendo la expresión de un carbohidrato reducido análogo en sistemas de expresión en mamíferos y en levadura. Los sitios de N-glicosilación en polipéptidos de eucariotas se caracterizan por un triplete aminoácido Asn-X-Y, en donde X es cualquier aminoácido y Y es Ser o Thr. Las sustituciones, adiciones, o supresiones apropiadas para la secuencia de nucleótidos que codifican estos tripletes resultara en la prevención de la unión de residuos de carbohidrato a la cadena lateral Asn. La alteración de un solo nucleótido, escogido para que la Asn sea remplazada por un aminoácido diferente, por ejemplo, es suficiente para inactivar un sitio de N-glicosilación. Alternativamente, la Ser o la Thr se pueden remplazar con otro aminoácido, tal como Ala. Los procedimientos conocidos para la inactivación de los sitios de N-glicosilación en proteínas incluyen aquellos descritos en la patente estadounidense No. 5.071.972 y la EP 276.846.

En otro ejemplo de variantes, las secuencias que codifican residuos de Cys que no son esenciales para la actividad biológica se pueden alterar para que causen que los residuos de Cys sean suprimidos o remplazados con otros aminoácidos, previniendo la formación de puentes disulfuro intramoleculares incorrectos por plegamiento o renaturalización.

Otros variantes se preparan por medio de modificación de residuos adyacentes de aminoácido dibásico, para mejorar la expresión en sistemas de levadura en los cuales está presente la actividad de la proteasa KEX2. EP 212.914 divulga el uso de mutagénesis específica para el sitio para inactivar los sitios de procesamiento de la proteasa KEX2 en una proteína. Los sitios de procesamiento de la proteasa KEX2 se inactivan por medio de supresión, añadiendo o sustituyendo residuos para alterar los pares Arg-Arg, Arg-Lys para eliminar la ocurrencia de estos residuos básicos adyacentes. Los emparejamientos Lys-Lys son considerablemente menos susceptibles a la escisión por KEX2, y la conversión de Arg-Lys o Lys-Arg a Lys-Lys representa una aproximación conservadora y preferida para inactivar los sitios de la KEX2.

#### *Oligómeros*

Abarcados por la invención se encuentran los oligómeros o las proteínas de fusión que contienen polipéptidos de TSLP humana. Tales oligómeros pueden estar en la forma de multímeros enlazados covalentemente o enlazados no covalentemente, incluidos dímeros, trímeros, u oligómeros superiores. Como se observó anteriormente, los polipéptidos preferidos son solubles y por lo tanto estos oligómeros pueden comprender polipéptidos solubles. En un aspecto de la invención, los oligómeros mantienen la habilidad de enlazamiento de los componentes del polipéptido y proveen por lo tanto, sitios de enlazamiento bivalente, trivalente, etc.

Una modalidad de la invención está dirigida a oligómeros que comprenden polipéptidos múltiples unidos a través de interacciones covalentes o no covalentes entre fracciones de péptido fusionadas a los polipéptidos. Tales péptidos pueden ser enlazadores de péptido (espaciadores), o péptidos que tienen la propiedad de promover la oligomerización. Los cierres de leucina y ciertos polipéptidos derivados de anticuerpos están entre los péptidos que pueden promover oligomerización de los polipéptidos unidos a ellos, como se describe con más detalle más adelante.

*Oligómeros basados en Inmunoglobulina*

Como una alternativa, un oligómero se prepara utilizando polipéptidos derivados de inmunoglobulinas. La preparación de proteínas de fusión comprende ciertos polipéptidos heterólogos fusionados a diferentes porciones de polipéptidos derivados de anticuerpo (incluido el dominio Fc), ha sido descrita, por ejemplo por (Ashkenazi y colaboradores, PNAS USA, 88:10535 (1991)); (Byrn y colaboradores, Nature, 344:677 (1990)); y (Hollenbaugh y Aruffo "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, páginas 10.19.1 - 10.19.11 (1992)).

Una modalidad de la presente invención está dirigida a un dímero que comprende dos proteínas de fusión creadas por medio de la fusión de un polipéptido de la invención a un polipéptido de Fc derivado de un anticuerpo. Una fusión génica que codifica a la proteína de fusión del polipéptido/Fc se inserta en un vector de expresión apropiado. Las proteínas de fusión del polipéptido/Fc se expresan en células huésped transformadas con el vector de expresión recombinante, y permitieron reunir moléculas como las del anticuerpo, con lo cual se forman enlaces disulfuro entre cadenas entre las fracciones de Fc para producir moléculas divalentes.

El término "polipéptido de Fc" como se lo utiliza aquí incluye las formas nativa y muteína de los polipéptidos integrados por la región Fc de un anticuerpo que comprende a todos los dominios CH de la región Fc. Las formas truncadas de tales polipéptidos que contienen a la región de bisagra que promueve la dimerización están también incluidas. Los polipéptidos preferidos comprenden a un polipéptido de Fc derivado de un anticuerpo de IgG1 humana.

Un polipéptido de Fc adecuado, descrito en la solicitud PCT WO 93/10151, es un polipéptido de cadena sencilla que se extiende desde la región bisagra N-terminal hasta el C-terminal nativo de la región Fc de un anticuerpo de IgG1 humana. Otro polipéptido útil de Fc es la muteína de Fc descrita en la patente estadounidense No. 5.457.035, y en (Baum y colaboradores, EMBO J., 13:3992-4001 (1994)). La secuencia de aminoácidos de esta muteína es idéntica a aquella de una secuencia nativa de Fc presentada en WO 93/10151, excepto por que el aminoácido 19 ha sido cambiado de Leu a Ala, al aminoácido 20 ha sido cambiado de Leu a Glu, y el aminoácido 22 ha sido cambiado de Gly a Ala. La muteína exhibe una afinidad reducida por los receptores de Fc.

Las proteínas de fusión anteriormente descritas que comprenden fracciones de Fc (y los oligómeros formados de allí) ofrecen la ventaja de una purificación fácil por medio de cromatografía de afinidad sobre columnas de Proteína A o Proteína B.

En otras modalidades, los polipéptidos de la invención pueden ser sustituidos por la porción variable de un anticuerpo de cadena pesada o liviana. Si las proteínas de fusión se elaboran con cadenas tanto pesadas como livianas de un anticuerpo, es posible formar un oligómero hasta con cuatro regiones extracelulares de TSLP.

*Oligómeros con Base en un Enlazador de Péptido*

Alternativamente, el oligómero es una proteína de fusión que comprende múltiples polipéptidos, con o sin enlazadores de péptido (péptidos espaciadores). Entre los enlazadores de péptido adecuado están aquellos descritos en las patentes estadounidenses Nos. 4.751.180 y 4.935.233. Se puede insertar una secuencia de ADN que codifica a un enlazador de péptido deseado entre, y en el mismo marco de lectura que, las secuencias de ADN de la invención, utilizando cualquier técnica convencional adecuada. Por ejemplo, un oligonucleótido sintetizado químicamente que codifica al enlazador puede estar ligado entre las secuencias. En modalidades particulares, una proteína de fusión comprende de dos a cuatro polipéptidos adecuados de TSLP, separada por medio de enlazadores de péptido.

*Cierres de Leucina*

Otro método para preparar los oligómeros de la invención involucra el uso de un cierre de leucina. Los dominios del cierre de leucina son péptidos que promueven la oligomerización de las proteínas en las cuales ellos se encuentran. Los cierres de leucina fueron identificados originalmente en diferentes proteínas de enlazamiento al ADN (Landschulz y colaboradores, Science 240:1759 (1988)), y han sido desde entonces encontradas en una variedad de proteínas diferentes. Entre los cierres conocidos de leucina están los péptidos de ocurrencia natural y los derivados de los mismos que dimerizan o trimerizan.

El dominio del cierre (también denominado aquí como un dominio oligomerizante, o formador de oligómero) comprende una repetición setena repetitiva, a menudo con cuatro o cinco residuos de leucina intercalados con otros aminoácidos. Ejemplos de dominios de cierre son aquellos encontrados en el factor de transcripción de levadura GCN4 y una proteína de enlazamiento al ADN estable al calor encontrada en hígado de rata (C/EBP; Landschulz y colaboradores, Science, 243:1681 (1989)). Dos proteínas nucleares de transformación, *fos* y *jun*, también exhiben dominios de cierre, como lo hace el producto génico del protooncogén murino, *c-myc* (Landschulz y colaboradores, Science, 240:1759 (1988)). Los productos de los oncogenes nucleares *fos* y *jun* comprenden los dominios de cierre que forman preferiblemente heterodímeros (O'Shea y colaboradores, Science, 245:646 (1989)), (Turner y Tjian, Science, 243:1689 (1989)). El dominio de cierre es necesario para la actividad biológica (enlazamiento de ADN) en estas proteínas.

Las proteínas fusogénicas de varios virus diferentes, incluidos paramixovirus, coronavirus, virus de sarampión y muchos retrovirus, también poseen dominios de cierre (Buckland y Wild, Nature, 338:547 (1989); Britton, Nature,

353:394 (1991)); (Delwart y Mosialos, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 6:703 (1990)). Los dominios de cierre en estas proteínas fusogénicas virales están cerca de la región transmembrana de las proteínas; se ha sugerido que los dominios de cierre podrían contribuir a la estructura oligomérica de las proteínas fusogénicas. La oligomerización de proteínas fusogénicas virales está involucrada en la formación de poros por fusión (Spruce y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:3523 (1991)). Se ha reportado recientemente también que los dominios de cierre juegan un papel en la oligomerización de factores de transcripción de choque térmico (Rabindran y colaboradores, *Science* 259:230 (1993)).

Los dominios de cierre se pliegan en forma reducida como bobinas paralelas en espiral (O'Shea y colaboradores, *Science* 254:539 (1991)). La arquitectura general de las bobinas paralelas en espiral han sido bien caracterizadas, con un empaquetamiento como de "botones en agujeros" como lo propusieron (Crick, *Acta Crystallogr.*, 6:689)). El dímero formado por un dominio de cierre se estabiliza por medio de la repetición setena, designada  $(abcdefg)_n$  de acuerdo a la notación de (McLachlan y Stewart, *J. Mol. Biol.*, 98:293 (1975)), en la cual los residuos *a* y *d* son generalmente residuos hidrófobos, con *d* siendo una leucina, que se alinean sobre la misma cara de una hélice. Los residuos cargados en forma opuesta comúnmente se presentan en las posiciones *g* y *e*. Así, en una bobina paralela en espiral formada a partir de dos dominios de cierre helicoidales, los "botones" formados por las cadenas laterales hidrófobas de la primera hélice están empaquetados en los "agujeros" formados entre las cadenas laterales de la segunda hélice.

Los residuos en posición *d* (a menudo leucina) contribuyen a las grandes energías hidrófobas de estabilización, y son importantes para la formación de oligómeros (Krystek y colaboradores, *Int. J. Peptide Res.*, 38:229 (1991)). (Lovejoy y colaboradores, *Science* 259:1288 (1993)) reportaron recientemente la síntesis de un haz tricatenario de hélice  $\alpha$  en el cual las hélices corren hacia arriba-hacia arriba-hacia abajo. Sus estudios confirmaron que la energía hidrófoba de estabilización proporcionan la fuerza conductora principal para la formación de bobinas en espiral a partir de monómeros helicoidales. Estos estudios también indican que las interacciones electrostáticas contribuyen a la estequiometría y a la geometría de las bobinas en espiral. Una discusión adicional sobre la estructura de los cierres de leucina se encuentra en (Harbury y colaboradores, *Science*, 262:1401 (26 de noviembre de 1993)).

Ejemplos de dominios de cierre de leucina adecuados para producir proteínas oligoméricas adecuadas se describen en la solicitud PCT WO 94/10308, y el cierre de leucina derivado de la proteína D tensoactiva del pulmón (SPD) descrita en (Hoppe y colaboradores, *FEBS Letters*, 344:191 (1994)). El uso de un cierre modificado de leucina que permita una trimerización estable de una proteína heteróloga fusionada a ella es descrito en (Fanslow y colaboradores, *Semin. Immunol.*, 6:267-278 (1994)). Las proteínas recombinantes de fusión que contienen un polipéptido soluble fusionado a un péptido de cierre de leucina se expresan en células huésped adecuadas, y el oligómero soluble que forma se recupera a partir del sobrenadante del cultivo.

Ciertas fracciones de cierre de leucina forman preferencialmente trímeros. Un ejemplo es un cierre de leucina derivado de la proteína D tensoactiva del pulmón (SPD), como se describe en (Hoppe y colaboradores, *FEBS Letters*, 344:191 (1994)) y en la patente estadounidense No. 5.716.805. Este péptido de cierre de leucina derivado de la SPD del pulmón contiene la secuencia de aminoácidos Pro Asp Val Ala Ser Leu Arg Gin Gln Val Glu Ala Leu Gin Gly Gin Val Gin His Leu Gin Ala Ala Phe Ser Gin Tyr (SEQ ID NO: 4).

Otro ejemplo de un cierre de leucina que promueve la trimerización es un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg, (SEQ ID NO: 5), como se describe en la patente estadounidense No. 5.716.805. En una modalidad alternativa, se añade un residuo de Asp N-terminal; en otra, el péptido carece del residuo de Arg N-terminal.

Se pueden emplear también fragmentos de los anteriores péptidos de cierre que retienen la propiedad de promover la oligomerización. Los ejemplos de tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a, péptidos que carecen de uno o dos de los residuos N-terminales o C-terminales presentes en las anteriores secuencias de aminoácidos. Los cierres de leucina se pueden derivar a partir de los péptidos de cierre de leucina de ocurrencia natural, por ejemplo, a través de sustitución(es) conservativa(s) en la secuencia nativa de aminoácidos, en donde se retiene la capacidad del péptido para promover oligomerización.

Se pueden emplear otros péptidos derivados de proteínas triméricas de ocurrencia natural en la preparación de oligómeros triméricos. Alternativamente, se pueden emplear péptidos sintéticos que promueven la oligomerización. En modalidades particulares, los residuos de leucina en una fracción de cierre de leucina se reemplazan por residuos de isoleucina. Tales péptidos que contienen isoleucina pueden denominarse como cierres de isoleucina, pero están abarcados por el término "cierres de leucina" como se los emplea aquí.

#### *Producción de polipéptidos y de fragmentos de los mismos*

La expresión, aislamiento y purificación de los polipéptidos y fragmentos de la invención se puede lograr por medio de cualquier técnica adecuada, incluyendo, pero sin limitarse a las siguientes:

*Sistemas de Expresión*

La presente invención también provee clonación recombinante y vectores de expresión que contienen ADN, así como células que contienen los vectores recombinantes. Los vectores de expresión que contienen ADN se pueden utilizar para preparar a los polipéptidos o fragmentos de la invención codificados por el ADN. Un método para producir polipéptidos comprende el cultivo de células huésped transformadas con un vector de expresión recombinante que codifica al polipéptido, bajo condiciones que promueven la expresión del polipéptido, recuperando luego al polipéptido expresado del cultivo. El operario calificado reconocerá que el procedimiento para purificar a los polipéptidos expresados variará de acuerdo a factores tales como el tipo de células huésped empleadas, y si el polipéptido está enlazado a la membrana o es una forma soluble que es segregada a partir de la célula huésped.

Se puede emplear cualquier sistema de expresión adecuado. Los vectores incluyen un ADN que codifica un polipéptido o fragmento de la invención, operativamente enlazado a secuencias adecuadas de nucleótidos reguladoras de transcripción o de traducción, tales como aquellas derivadas de un gen de mamífero, microbiano, viral o de insecto. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores transcripcionales, operadores, o reforzadores, un sitio de enlazamiento ribosomal de ARNm, y secuencias apropiadas que controlan la iniciación y la terminación de la transcripción y de la traducción. Las secuencias de nucleótidos están operativamente enlazadas cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente con la secuencia de ADN. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos promotora está operativamente enlazada a una secuencia de ADN si la secuencia de nucleótidos promotora controla la transcripción de la secuencia de ADN. Un origen de replicación que confiere la habilidad de replicarse en las células huésped deseadas, y un gen de selección por medio del cual se identifican los transformantes, generalmente se incorporan dentro del vector de expresión.

Además, se puede incorporar una secuencia que codifique a un péptido señal apropiado (nativo o heterólogo) dentro de los vectores de expresión. Una secuencia de ADN para un péptido señal (líder secretor) se puede fusionar en el marco a la secuencia de ácido nucleico de la invención para que el ADN sea inicialmente transcrito, y el ARNm traducido, en una proteína que contiene al péptido señal. Un péptido señal que es funcional en las células huésped deseadas promueve la secreción extracelular del polipéptido. El péptido señal se escinde del polipéptido por secreción del polipéptido de la célula.

El operario capacitado reconocerá también que la(s) posición(es) en la(s) cual(es) se escinde el péptido señal puede(n) diferir de aquella(s) predicha(s) por medio del programa de computador, y puede variar de acuerdo a factores tales como el tipo de células huésped empleadas en la expresión de un polipéptido recombinante. Una preparación de proteína puede incluir una mezcla de moléculas de proteína que tienen diferentes aminoácidos N-terminales, que resultan de la escisión del péptido señal en más de un sitio. Las modalidades particulares de proteínas maduras suministradas aquí incluyen, pero no se limitan a, proteínas que tienen el residuo en la posición 16, 29, 35, 95 ó 117 de la SEQ ID NO: 2, como el aminoácido N-terminal.

Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos incluyen células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Se prefieren generalmente células de mamífero o de insecto para ser utilizadas como células huésped. Se describen vectores apropiados de clonación y de expresión para ser utilizados con huéspedes celulares bacterianos, de hongos, levaduras y de mamíferos, por ejemplo, en (Pouwels y colaboradores, Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, (1985)). También se podrían emplear sistemas de traducción libres de células para producir polipéptidos utilizando los ARN derivados de construcciones de ADN divulgadas aquí.

*Sistemas Procariotas*

Los procariotas incluyen organismos gram-negativos y gram-positivos. Las células huésped procariotas adecuadas para transformación incluyen, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y varias otras especies dentro del género *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*. En una célula huésped procariota, tal como *E. coli*, un polipéptido puede incluir un residuo de metionina N-terminal para facilitar la expresión del polipéptido recombinante en la célula huésped procariota. La Met N-terminal se puede escindir a partir del polipéptido recombinante expresado.

Los vectores de expresión para ser usados en células huésped procariotas generalmente contienen uno o más genes marcadores seleccionables fenotípicos. Un gen marcado seleccionable fenotípico es, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia antibiótica o que suple un requerimiento autotrófico. Los ejemplos de vectores de expresión útiles para células huésped procariotas incluyen a aquellos derivados de plásmidos comercialmente disponibles tales como el vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). pBR322 contiene genes para resistencia a la ampicilina y a la tetraciclina y de esta forma proveen un medio simple para identificar células transformadas. Un promotor apropiado y una secuencia de ADN se insertan dentro del vector pBR322. Otros vectores comercialmente disponibles incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, Estados Unidos de América).

Las secuencias promotoras comúnmente utilizadas por los vectores de expresión de células huésped procariotas recombinantes incluyen  $\beta$ -lactamasa (penicilinas), un sistema promotor de lactosa (Chang y colaboradores, Nature 275:615 (1978); y (Goeddel y colaboradores, Nature 281:544 (1979)), sistema promotor de triptófano (trp) (Goeddel y colaboradores, Nucl. Acids Res. 8:4057 (1980); y EP-A-36776) y el promotor tac (Maniatis, Molecular Cloning: A

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 412 (1982)). Un sistema de expresión particularmente útil de célula huésped procariota emplea un promotor  $\lambda P_L$  de fago y una secuencia represora termolábil cI857ts. Los vectores plásmidos disponibles en la American Type Culture Collection que incorporan derivados del promotor  $\lambda P_L$  incluyen al plásmido pHUB2 (residente en la cepa JMB9 de *E. coli*, ATCC 37092) y al plásmido pPLc28 (residente en la cepa RR1 de *E. coli*, ATCC 53082).

#### Sistemas de Levadura

Alternativamente, los polipéptidos se pueden expresar en células huésped de levadura, preferiblemente del género *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. cerevisiae*). También se pueden emplear otros géneros de levadura, tales como *Pichia* o *Kluyveromyces*. Los vectores de levadura contendrán a menudo un origen de secuencia de replicación de un plásmido de levadura  $2\mu$ , una secuencia de replicación autónoma (ARS), una región promotora, secuencias para poliadenilación, secuencias para terminación de la transcripción, y un gen marcador seleccionable. Las secuencias promotoras adecuadas para vectores de levadura incluyen, entre otros, promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 255:2073 (1980)) u otras enzimas glicolíticas (Hess y colaboradores, *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149 (1968)); y (Holland y colaboradores, *Biochem.* 17:4900 (1978)), tal como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa. Otros vectores y promotores adecuados para ser usados en la expresión de levadura se describen adicionalmente (Hitzeman, EPA-73,657). Otra alternativa es el promotor ADH2 represor de glucosa descrito por (Russell y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 258:2674 (1982)) y (Beier y colaboradores, *Nature* 300:724 (1982)). Los vectores lanzadera replicables tanto en levadura como en *E. coli* se pueden construir por medio de la inserción de secuencias de ADN de pBR322 por selección y replicación en *E. coli* (gen Amp<sup>r</sup> y origen de replicación) dentro de los vectores de levadura anteriormente descritos.

La secuencia líder del factor  $\alpha$  de levadura se puede emplear para dirigir la secreción del polipéptido. La secuencia líder del factor  $\alpha$  se inserta a menudo entre la secuencia promotora y la secuencia estructural del gen. Ver, por ejemplo, (Kurjan y colaboradores, *Cell* 30:933 (1982)) y (Bitter y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5330 (1984)). Otras secuencia líder adecuadas para facilitar la secreción de polipéptidos recombinantes a partir de huéspedes de levadura son conocidas por aquellos capacitados en el arte. Una Secuencia líder se puede modificar cerca de su extremo 3' para contener uno o más sitios de restricción. Esto facilitará la fusión de la Secuencia líder al gen estructural.

Los protocolos de transformación de la levadura son conocidos por aquellos capacitados en el arte. Uno de tales protocolos es descrito por (Hinnen y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929 (1978)). El protocolo de Hinnen y colaboradores selecciona a los transformantes de Trp<sup>+</sup> en un medio selectivo, donde el medio selectivo consta de 0,67% de base nitrogenada de levadura, 0,5% de ácidos casamino, 2% de glucosa, 10 mg/ml de adenina y 20 mg/ml de uracilo.

Se pueden desarrollar células huésped de levadura, transformadas por medio de vectores que contienen una secuencia promotora ADH2, para inducir la expresión en un medio "rico". Un ejemplo de un medio rico es uno que consiste de 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, y 1% de glucosa, suplementado con 80 mg/ml de adenina y 80 mg/ml de uracilo. La desrepresión del promotor ADH2 ocurre cuando se agota la glucosa del medio.

#### Sistemas de Mamífero o de Insecto

Los sistemas de cultivo de células huésped de mamífero o de insecto se pueden emplear también para expresar polipéptidos recombinantes. Los sistemas de *Baculovirus* para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos son revisados por (Luckow y Summers, *Bio/Technology*, 6:47 (1988)). También se pueden emplear líneas celulares establecidas de origen mamífero. Los ejemplos de líneas de células huésped adecuadas de mamífero incluyen a la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman y colaboradores, *Cell* 23:175 (1981)), células L, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, y líneas celulares BHK (ATCC CRL 10), y a la línea celular CV1/EBNA derivada de la línea de células CV1 de riñón de mono verde del África (ATCC CCL 70) como lo describen (McMahan y colaboradores, *EMBO J.*, 10: 2821 (1991)).

Los métodos establecidos para introducir ADN en células de mamífero han sido descritos (Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture*, páginas 15-69 (1990)). Se pueden utilizar protocolos adicionales utilizando reactivos comercialmente disponibles, tales como el reactivo lípido Lipofectamina (Gibco/BRL) o el reactivo lípido Lipofectamina-Plus, para transfectar células (Felgner y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417 (1987)). Además, se puede utilizar electroporación para transfectar células de mamífero utilizando procedimientos convencionales, tales como aquellos en (Sambrook y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 ed. Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). La selección de transformantes estables se puede llevar a cabo utilizando métodos conocidos en el arte, tales como, por ejemplo, la resistencia a drogas citotóxicas. (Kaufman y colaboradores, *Meth. in Enzymology* 185:487-511 (1990)), describen varios esquemas de selección, tales como la resistencia a la dihidrofolato reductasa (DHFR). Una cepa huésped adecuada para la selección de la DHFR puede ser la cepa DX-B11 de CHO, que es deficiente en DHFR (Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220 (1980)). Se puede introducir un plásmido que expresa al ADNc de la DHFR dentro de la cepa DX-B11, y únicamente pueden crecer las células que contienen al plásmido en el medio selectivo apropiado. Se pueden incorporar otros ejemplos de marcadores seleccionables dentro de un vector de expresión que incluye los ADNc que confieren resistencia a

antibióticos, tales como G418 e higromicina B. Se pueden seleccionar células que hospedan al vector con base en la resistencia de estos compuestos.

Las secuencias de control transcripcional y de traducción para los vectores de expresión de células huésped de mamífero se pueden cortar de los genomas virales. Las secuencias promotoras y las secuencias reforzadoras comúnmente utilizadas se derivan del virus poliovirus, del adenovirus 2, del virus simio 40 (SV40), y de citomegalovirus humano. Las secuencias de ADN derivadas del genoma viral SV40, por ejemplo, el promotor de origen, temprano y tardío de SV40, los sitios de refuerzo, de empalme, y de poliadenilación se pueden utilizar para proveer otros elementos genéticos para expresión de una secuencia génica estructural en una célula huésped de mamífero. Los promotores virales temprano y tardío son particularmente útiles ya que ambos se obtienen fácilmente a partir de un genoma viral como un fragmento, que puede contener también un origen viral de replicación (Fiers y colaboradores, *Nature* 273:113 (1978)); (Kaufman, Meth. en *Enzymology* (1990)). También se pueden utilizar fragmentos mayores y menores de SV40, con tal de que se incluya la Secuencia de aproximadamente 250 pb que se extiende desde el sitio *Hind* III hacia el sitio *Bgl* I localizado en el origen viral SV40 del sitio de replicación.

Secuencias adicionales de control que muestran que mejoran la expresión de genes heterólogos de vectores de expresión de mamíferos incluyen elementos tales como el elemento de la secuencia que aumenta la expresión (EASE) derivado de células CHO (Morris y colaboradores, *Animal Cell Technology*, páginas 529-534 y la Solicitud PCT WO 97/25420 (1997)) y el líder tripartita (TPL) y los ARN del gen VA del Adenovirus 2 (Gingeras y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 257:13475-13491 (1982)). Las secuencias internas del sitio de entrada del ribosoma (IRES) de origen viral permiten que los ARNm dicistrónicos sean traducidos eficientemente (Oh y Sarnow, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:295-300 (1993)); (Ramesh y colaboradores, *Nucleic Acids Research* 24:2697-2700 (1996)). La expresión de un ADNc heterólogo como parte de un ARNm dicistrónico seguido por el gen para un marcador seleccionable (por ejemplo DHFR) ha mostrado que mejora la transfectabilidad del huésped y la expresión del ADNc heterólogo (Kaufman, Meth. en *Enzymology* (1990)). Ejemplos de vectores de expresión que emplean los ARNm dicistrónicos son pTR-DC/GFP descritos por (Mosser y colaboradores, *Biotechniques* 22:150-161 (1997)), y p2A5I descrito por (Morris y colaboradores, *Animal Cell Technology*, páginas 529-534 (1997)).

Un vector útil de expresión alta, pCAVNOT, ha sido descrita por (Mosley y colaboradores, *Cell* 59:335-348 (1989)). Se pueden construir otros vectores de expresión para uso en células huésped de mamífero como lo divulgaron (Okayama y Berg, *Mol. Cell. Biol.* 3:280 (1983)). Un sistema útil para expresión estable de alto nivel de los ADNc de mamífero en células epiteliales mamarias murinas C127 se pueden construir sustancialmente como lo describen (Cosman y colaboradores, *Mol. Immunol.* 23:935 (1986)). Un vector útil de expresión alta, PMLSV N1/N4, descrito por (Cosman y colaboradores, *Nature* 312:768 (1984)), ha sido depositado como ATCC 39890. Vectores adicionales útiles de expresión de mamífero se describen en EP-A-0367566, y en WO 91/18982. En aún otra modalidad alternativa, los vectores se pueden derivar de retrovirus.

Se puede utilizar otro vector útil de expresión, pFLAG<sup>®</sup>. La tecnología con FLAG<sup>®</sup> se centra en la fusión de un péptido marcador FLAG<sup>®</sup>, hidrófobo, de bajo peso molecular (1kD), con el N-terminal de una proteína recombinante expresada por los vectores de expresión pFLAG<sup>®</sup>. pDC311 es otro vector especializado utilizado para expresión de proteínas en células CHO. pDC311 se caracteriza por una secuencia bicistrónica que contiene el gen de interés y un gen para la dihidrofolato reductasa (DHFR) con un sitio interno de enlazamiento al ribosoma para la traducción de la DHFR, un elemento de la secuencia para aumento de la expresión (EASE), el promotor CMV humano, una secuencia líder tripartita, y un sitio de poliadenilación.

Con relación a los péptidos señal que pueden ser empleados, el péptido señal nativo se puede reemplazar por un péptido señal heterólogo o una secuencia líder, si se desea. La escogencia de un péptido señal o líder puede depender de factores tales como el tipo de células huésped en las cuales se va a producir el polipéptido recombinante. Para ilustración, los ejemplos de péptidos señal heterólogos que son funcionales en células huésped de mamífero incluyen la secuencia señal para la interleuquina-7 (IL-7) descrita en la patente estadounidense No. 4.965.195; la secuencia señal para el receptor de interleuquina-2 receptor descrita en (Cosman y colaboradores, *Nature* 312:768 (1984)); el péptido señal del receptor de interleuquina-4 descrito en EP 367.566; el péptido señal tipo I del receptor de interleuquina-4 descrito en la patente estadounidense No. 4.968.607; y el péptido señal tipo II del receptor de interleuquina-1 descrito en EP 460.846.

### Purificación

La invención también incluye métodos de aislamiento y purificación de los polipéptidos y fragmentos de los mismos.

### Aislamiento y Purificación

Los polipéptidos "aislados" o fragmentos de los mismos abarcados por esta invención son polipéptidos o fragmentos que no están en un ambiente idéntico al ambiente en el cual él o ellos se pueden encontrar en la naturaleza. Los polipéptidos o los fragmentos de los mismos "purificados" abarcados por esta invención son esencialmente libres de asociarse con otras proteínas o polipéptidos, por ejemplo, como un producto de purificación de sistemas de expresión recombinante tal como aquellos descritos anteriormente o como un producto purificado a partir de una fuente no recombinante tal como las células y/o los tejidos que se presentan en forma natural.

En una modalidad preferida, la purificación de los polipéptidos o fragmentos recombinantes se puede lograr utilizando fusiones de polipéptidos o de fragmentos de la invención con otro polipéptido para ayudar en la purificación de los polipéptidos o los fragmentos de la invención. Tales compañeros de fusión pueden incluir al poli-His o a otros péptidos antigénicos de identificación descritos anteriormente así como a las fracciones de Fc descritas previamente.

Con respecto a cualquier tipo de célula huésped, como lo sabe un operario calificado, los procedimientos para purificación de un polipéptido o fragmento recombinante variara de acuerdo a factores tales como el tipo de células huésped empleadas y si el polipéptido o fragmento recombinante es secretado dentro del medio de cultivo o no.

En general, el polipéptido o fragmento recombinante se pueden aislar de las células huésped si no son secretados, o del medio o sobrenadante si son solubles y secretados, seguida por una o más etapas de concentración, desestabilización salina, intercambio iónico, interacción hidrófoba, cromatografía de purificación por afinidad o de exclusión por tamaño. Como formas específicas para realizar estas etapas, se puede concentrar primero el medio de cultivo utilizando un filtro para concentración de proteína comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Pellicon de Amicon o de Millipore. Después de la etapa de concentración, se puede aplicar el concentrado a una matriz de purificación tal como un medio de filtración por gel. Alternativamente, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tenga grupos dietilaminoetilo (DEAE) en su estructura. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. Alternativamente, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diferentes matrices insolubles que contienen grupos sulfopropilo o carboximetilo. Además, se puede emplear una etapa cromatoenfoco. Alternativamente, se puede emplear una etapa de cromatografía de interacción hidrófoba. Las matrices adecuadas pueden ser fracciones fenilo u octilo enlazadas a resinas. Además, se puede emplear cromatografía de afinidad con una matriz que selectivamente enlaza a la proteína recombinante. Ejemplos de tales resinas empleadas para columnas de lectina, columnas de coloración, y columnas de quelación metálica. Finalmente, se pueden emplear una o más etapas de cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC) que emplean un medio hidrófobo para RP-HPLC, (por ejemplo, gel de sílice o una resina polimérica que tienen grupos metilo, octilo, octildecilo u otros grupos alifáticos en su estructura) para purificar adicionalmente los polipéptidos. Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diferentes combinaciones, son bien conocidas y pueden ser empleadas para proveer una proteína recombinante aislada y purificada.

También es posible utilizar cualquier columna de afinidad que contenga una proteína para enlazamiento del polipéptido de la invención, tal como un anticuerpo monoclonal generado contra polipéptidos de la invención, para polipéptidos expresados por purificación por afinidad. Estos polipéptidos se pueden remover de una columna de afinidad utilizando técnicas convencionales, por ejemplo, en un amortiguador de elusión de alta concentración salina, y luego dializados en un amortiguador para uso de concentración salina más baja o por medio del cambio del pH o de otros componentes dependiendo de la matriz de afinidad utilizada, o ser completamente removidos utilizando el sustrato de ocurrencia natural de la fracción de afinidad, tal como un polipéptido derivado de la invención.

En este aspecto de la invención, las proteínas para enlazamiento del polipéptido tal como los anticuerpos antipolipéptido de la invención u otras proteínas que pueden interactuar con el polipéptido de la invención, se pueden enlazar a un soporte en fase sólida tal como una matriz para cromatografía en columna o un sustrato similar adecuado para identificar, separar, o purificar células que expresan polipéptidos de la invención sobre su superficie. La adherencia de las proteínas para enlazamiento del polipéptido de la invención a una superficie de contacto en fase sólida se puede lograr por cualquier medio, por ejemplo, las microesferas magnéticas se pueden recubrir con estas proteínas para enlazamiento del péptido y mantenerlas en el vaso de incubación a través de un campo magnético. Las suspensiones de mezclas de células se ponen en contacto con la fase sólida que tiene tales proteínas de enlazamiento del polipéptido sobre ella. Las células que tienen a los polipéptidos de la invención sobre su superficie enlazados a la proteína fijada para enlazamiento del polipéptido y luego se retiran por medio de lavado las células no enlazadas. Este método de enlazamiento por afinidad es útil para la purificación, el tamizado, o la separación de tales células que expresan al polipéptido de la solución. Los métodos de liberación de las células seleccionadas positivamente a partir de la fase sólida son conocidos en el arte y abarcan, por ejemplo, el uso de enzimas. Tales enzimas son preferiblemente no tóxicas y no lesionan a las células, y están preferiblemente dirigidas a la escisión del compañero de enlazamiento sobre la superficie de la célula.

Alternativamente, se pueden incubar primero las mezclas de células que se sospecha que contienen células que expresan al polipéptido de la invención con una proteína biotinilada para enlazamiento del polipéptido de la invención. Los periodos de incubación son típicamente al menos de una hora de duración para garantizar un enlazamiento suficiente para los polipéptidos de la invención. La mezcla resultante es pasada luego a través de una columna empacada con perlas recubiertas de avidina por lo cual la alta afinidad de la biotina por la avidina provee el enlazamiento de las células para enlazamiento del polipéptido a las perlas. El uso de perlas recubiertas de avidina es conocido en el arte. Ver (Berenson y colaboradores, *J. Cell. Biochem.*, 10D:239 (1986)). El lavado del material no enlazado y la liberación de las células enlazadas se lleva a cabo utilizando métodos convencionales.

El grado deseado de pureza depende del uso que se le pretenda dar a la proteína. Se desea un grado relativamente alto de pureza cuando el polipéptido va a ser administrado *in vivo*, por ejemplo. En tal caso, se purifican los polipéptidos de tal manera que no sean detectables las bandas de proteína correspondientes a otras proteínas después del análisis por medio de electroforesis en gel de acrilamida-SDS (SDS-PAGE). Alguien capacitado en el campo pertinente reconocerá que se pueden visualizar múltiples bandas correspondientes al polipéptido por medio de SDS-PAGE,

debido a glicosilación diferencial, a procesamiento postraduccional diferencial, y similares. Más preferiblemente, el polipéptido de la invención se purifica hasta homogeneidad sustancial, como se indica por medio de una banda única de proteína por medio de análisis SDS-PAGE. La banda de proteína se puede visualizar por medio de coloración con plata, coloración con azul de Coomassie, o (si la proteína está radiomarcada) por medio de autoradiografía.

## Ensayos

Los polipéptidos preferidos de la invención (incluidas proteínas, polipéptidos, fragmentos, variantes, oligómeros, y otras formas) pueden ser analizados por la capacidad para enlazar receptores de TSLP en cualquier análisis adecuado, tal como un ensayo de enlazamiento convencional. Para ilustración el polipéptido puede ser marcado con un reactivo detectable (por ejemplo, un radionúclido, un cromóforo, una enzima que catalice una reacción colorimétrica o fluorométrica, y similares). El polipéptido marcado se pone en contacto con células que expresen a los receptores de TSLP. Se lavan entonces las células para remover al polipéptido marcado no enlazado, y se determina la presencia de marcadores enlazados a las células por medio de una técnica adecuada, escogida de acuerdo con la naturaleza del marcador.

Un ejemplo de un procedimiento de ensayo de enlazamiento es el siguiente. Se construye un vector de expresión recombinante que contiene ADNc de TSLP por medio de métodos conocidos en el arte. El receptor de TSLP de ratón contiene un dominio extracelular N-terminal, una región transmembrana, y un dominio citoplasmático C-terminal. Se transfectan células CV1-EBNA-1 en placas de 10 cm<sup>2</sup> con el vector de expresión recombinante. Las células CV1-EBNA-1 (ATCC CRL 10478) expresan constitutivamente al antígeno-1 nuclear EBV dirigido desde el promotor/reforzador temprano-inmediato de CMV. CV1-EBNA-1 se deriva de la línea celular CV-1 (ATCC CCL 70) de riñón de Mono Verde Africano, como lo describieron (McMahan y colaboradores, *EMBO. J.* 10:2821 (1991)).

Las células transfectadas se cultivan durante 24 horas, y luego se dividen las células en cada placa en una placa de 24 pozos. Después de cultivar durante 48 horas adicionales, se lavan las células transfectadas (aproximadamente 4 x 10<sup>4</sup> células/pozo) con BM-NFDM, que es un medio de enlazamiento (RPMI 1640 que contiene 25 mg/ml de albúmina de suero bovino, 2 mg/ml de azida de sodio, Hepes 20 mM pH 7,2) a los cuales se les ha añadido 50 mg/ml de leche seca libre de grasa. Se incuban luego las células durante 1 hora a 37°C con diferentes concentraciones de, por ejemplo, un polipéptido soluble/una proteína de fusión Fc elaborados como se expuso anteriormente. Se lavan entonces las células y se incuban con una concentración de saturación constante de una IgG antihumana de ratón-<sup>125</sup>I en medio de enlazamiento, con agitación suave durante 1 hora a 37°C. Después de un extensivo lavado, se liberan las células a través de tripsinización.

La IgG antihumana de ratón empleada anteriormente se dirige contra la región Fc de IgG humana y se puede obtener con Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA. Se marca en forma radioactiva al anticuerpo utilizando el método estándar de la cloramina-T. El anticuerpo se enlazara a la porción de Fc de cualquier polipéptido/proteína de Fc que se haya enlazado a las células. En todos los ensayos, se analiza el enlazamiento no específico de anticuerpo-<sup>125</sup>I en ausencia de la proteína de fusión Fc/Fc, así como en presencia de la proteína de fusión Fc y un exceso molar de 200 veces del anticuerpo IgG antihumano de ratón no marcado.

Se cuantifica el anticuerpo-<sup>125</sup>I enlazado a la célula sobre un contador Packard Autogamma. Los cálculos de afinidad (Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660 (1949)) se generan sobre RS/1 (BBN Software, Boston, MA) que corre sobre un computador Microvax.

Otro tipo de ensayo adecuado de enlazamiento es un ensayo de enlazamiento competitivo. Para ilustrarlo, se puede determinar la actividad biológica de una variante evaluando la habilidad de la variante para competir con la proteína nativa por el enlazamiento a los receptores de TSLP.

Los ensayos de enlazamiento competitivo se pueden llevar a cabo por medio de metodología convencional. Los reactivos que se pueden emplear en los ensayos de enlazamiento competitivo incluyen a la TSLP marcada en forma radioactiva y a células intactas que expresan a los receptores de TSLP (endógenos o recombinantes) sobre la superficie de la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un fragmento soluble marcado en forma radioactiva de TSLP para competir con una variante soluble de TSLP por el enlazamiento a los receptores de TSLP de la superficie de la célula. En vez de células intactas, se podría sustituir un receptor soluble de TSLP/proteína de fusión Fc enlazada a una fase sólida a través de la interacción de la Proteína A o de la Proteína G (sobre la fase sólida) con la fracción Fc. Las columnas cromatográficas que contienen Proteína A y Proteína G incluyen a aquellas disponibles con Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ.

Otro tipo de ensayo de enlazamiento competitivo utiliza al receptor soluble de TSLP, tal como un receptor soluble de TSLP/proteína de fusión, y células intactas que expresan un receptor endógeno o recombinante de TSLP. El receptor marcado en forma radiactiva de TSLP puede ser utilizado para competir con el receptor de TSLP enlazado a la membrana para TSLP soluble. Los resultados cuantitativos se pueden obtener por medio de ensayos de enlazamiento competitivo en placa autorradiográfica, mientras que se pueden utilizar gráficas Scatchard (Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660 (1949)) para generar resultados cuantitativos.

*Uso del ácido nucleico o de los oligonucleótidos de la TSLP humana*

Además de ser utilizados para expresar polipéptidos como se describió anteriormente, se pueden utilizar los ácidos nucleicos de la invención, incluidos ADN, ARN, ARNm y los oligonucleótidos de los mismos:

- como sondas para identificar al ácido nucleico que codifica a las proteínas que tienen la capacidad de inducir la proliferación de células de linaje B o de linaje T;
- para identificar al cromosoma humano número 5;
- para cartografiar genes sobre el cromosoma humano número 5;
- para identificar a los genes asociados con ciertas enfermedades, síndromes, u otras condiciones asociadas con el cromosoma humano número 5;
- como oligonucleótidos monocatenarios sentido o antisentido, para inhibir la expresión del polipéptido codificado por el gen de TSLP;
- para ayudar a detectar a los genes defectuosos en un individuo; y
- para terapia génica.

*Sondas*

Entre los usos de los ácidos nucleicos de la invención está el uso de fragmentos como sondas o iniciadores. Tales fermentos generalmente contienen al menos aproximadamente 17 nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN. En otras modalidades, un fragmento de ADN contiene al menos 30, o al menos 60, nucleótidos contiguos de una secuencia de ADN.

Debido a que se contemplan aquí homólogos de la SEQ ID NO: 1, de otras especies de mamíferos, se pueden utilizar sondas basadas en la secuencia de ADN humano de la SEQ ID NO: 1 para seleccionar las bibliotecas de ADNc derivadas de otras especies de mamíferos, utilizando técnicas convencionales de hibridación cruzada entre especies.

Utilizando el conocimiento del código genético en combinación con las secuencias de aminoácidos expuestas anteriormente, se pueden preparar juegos de oligonucleótidos degenerados. Tales oligonucleótidos son útiles como iniciadores, por ejemplo, en reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), por medio de las cuales se aíslan y amplifican fragmentos de ADN.

*Cartografía del Cromosoma*

Todos o una porción de los ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 1, incluidos los oligonucleótidos, pueden ser utilizados por aquellos capacitados en el arte utilizando técnicas conocidas para identificar al cromosoma humano 5, y al locus específico del mismo, que puede contener al ADN de otros miembros de la familia de TSLP. Las técnicas útiles incluyen, pero no se limitan a, utilizar la secuencia o porciones, incluidos los oligonucleótidos, como una sonda en diferentes técnicas conocidas tales como la cartografía del híbrido por radiación (alta resolución), hibridación *in situ* para extensiones del cromosoma (resolución moderada), hibridación de transferencia de Southern para líneas celulares híbridas que contienen cromosomas humanos individuales (baja resolución).

Por ejemplo, los cromosomas se pueden cartografiar por medio del uso de PCR e hibridación por radiación. La PCR se lleva a cabo utilizando el panel del Center for Genome Research Genebridge4 del Whitehead Institute/MIT de 93 híbridos por radiación ([http://www.genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/human\\_STS\\_releases/july97/rhmap/genebridge4.html](http://www.genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/human_STS_releases/july97/rhmap/genebridge4.html)). Se utilizan los iniciadores que caen dentro de una exón putativo, a través de un intrón, o a través de un fragmento intrón-exón del gen de interés y que amplifican a un producto del ADN genómico humano, pero no amplifican, por ejemplo, al ADN genómico del hámster de control. Los resultados de los PCR se convierten en un vector de datos que se somete al sitio de Cartografiado por Radiación en el Whitehead/MIT en Internet (<http://www.seq.wi.mit.edu>). Se anotan los datos y se provee la asignación cromosómica y la ubicación relativa para los marcadores conocidos del Sequence Tag Site (STS) sobre el mapa del híbrido por radiación. El siguiente sitio web proporciona información adicional acerca del mapeo del híbrido por radiación: ([http://www.genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/human\\_STS\\_releases/july97/07-97.INTRO.html](http://www.genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/human_STS_releases/july97/07-97.INTRO.html)).

*Identificación de Enfermedades Asociadas*

Como se expone más adelante, se ha cartografiado la SEQ ID NO: 1 para la región q21-q22 del cromosoma 5 por medio de análisis sinténico del gen de murino. De este modo, alguien capacitado en el arte puede utilizar el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 o un fragmento del mismo utilizando técnicas conocidas para analizar las anomalías asociadas con el cromosoma humano número 5 y, en particular, con la región q21-q22 del cromosoma número 5, incluido el síndrome de Gardner, poliposis coli adenomatosa, enfermedad desmoide hereditaria, síndrome de Turcot,

y cáncer colorectal. Esto permite distinguir las condiciones en las cuales este marcador es reordenado o suprimido. Además, se pueden utilizar nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de los mismos como un marcador de posición para cartografiar otros genes de ubicación desconocida.

Se puede utilizar el ADN en el desarrollo de tratamientos para cualquier trastorno mediado (directa o indirectamente) por cantidades deficientes o insuficientes de los genes correspondientes a los ácidos nucleicos de la invención. La divulgación que se hace aquí de las secuencias nativas de nucleótidos permite la detección de genes defectuosos y el remplazo de los mismos con genes normales. Los genes defectuosos se pueden detectar por medio de ensayos de diagnóstico *in vitro*, y por medio de la comparación de una secuencia nativa de nucleótidos divulgada aquí con aquella de un gen derivado de una persona de la que se sospecha que alberga un defecto en este gen.

#### *Sentido-Antisentido*

Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos incluyen oligonucleótidos sentido o antisentido que contienen una secuencia monocatenaria de ácido nucleico (ya sea ARN o ADN) capaz de enlazarse a secuencias objetivo de ARNm (sentido) o de ADN (antisentido). Los oligonucleótidos sentido o antisentido, de acuerdo con la presente invención, contiene un fragmento de ADN (SEQ ID NO: 1). Tal fragmento generalmente contiene al menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente aproximadamente desde 14 hasta aproximadamente 30 nucleótidos. La habilidad para derivar un oligonucleótido sentido o uno antisentido, con base en una secuencia de ADNc que codifica a una proteína dada se describe, por ejemplo en (Stein y Cohen, *Cancer Res.* 48:2659 (1988)) y (van der Krol y colaboradores, *BioTechniques* 6:958 (1988)).

El enlazamiento de oligonucleótidos sentido o antisentido a secuencias objetivo de ácido nucleico resulta en la formación de dobletes que bloquean o inhiben la expresión de la proteína por medio de una o varias formas, incluida la degradación mejorada del ARNm por medio de ARNasaH, inhibición del empalme, terminación prematura de la transcripción o de la traducción, o por otros medios. Por lo tanto se pueden utilizar oligonucleótidos antisentido para bloquear la expresión de las proteínas. Los oligonucleótidos sentido o antisentido comprenden además oligonucleótidos que tienen columnas vertebrales azúcar-fosfodiéster modificadas (u otros enlaces por azúcar, tal como aquellos descritos en WO 91/0662) y en donde tales enlaces de azúcar son resistentes a las nucleasas endógenas. Tales oligonucleótidos con enlaces de azúcar resistentes son estables *in vivo* (esto es, capaces de resistir degradación enzimática) pero retienen la especificidad de la secuencia que es capaz de enlazarse a secuencias de nucleótidos objetivo.

Otros ejemplos de oligonucleótidos sentido o antisentido incluyen a aquellos oligonucleótidos que están covalentemente enlazados a fracciones orgánicas, tales como aquellas descritas en WO 90/10448, y otras fracciones que incrementan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácido nucleico objetivo, tal como poli-(L-lisina). Aún más, agentes de intercalación, tales como la elipticina, y agentes de alquilación o complejos metálicos se pueden unir a oligonucleótidos sentido o antisentido para modificar la especificidad de enlazamiento del oligonucleótido sentido o antisentido para la secuencia nucleótida objetivo.

Se pueden introducir oligonucleótidos sentido o antisentido en una célula que contiene la secuencia objetivo de ácido nucleico por medio de cualquier método de transferencia génica, incluida, por ejemplo, lipofección, transfección de ADN mediada por  $\text{CaPO}_4$ , electroporación, o por medio del uso de vectores para transferencia génica tales como el virus de Epstein-Barr.

También se pueden introducir oligonucleótidos sentido o antisentido dentro de una célula que contiene la secuencia de nucleótidos objetivo por medio de la formación de un conjugado con una molécula de enlazamiento al ligando, como se describe en WO 91/04753. Las moléculas adecuadas de enlazamiento al ligando incluyen, pero no se limitan a, receptores en la superficie de la célula, factores de crecimiento, otras citoquinas, u otros ligandos que se enlazan a receptores en la superficie de la célula. Preferiblemente, la conjugación de la molécula de enlazamiento no interfiere sustancialmente con la habilidad de la molécula de enlazamiento al ligando para enlazarse a su correspondiente molécula o receptor, o para bloquear la entrada del oligonucleótido sentido o antisentido o su versión conjugada dentro de la célula.

Alternativamente, se puede introducir un oligonucleótido sentido o uno antisentido en una célula que contiene a la secuencia de ácido nucleico objetivo por medio de la formación de un complejo oligonucleótido-lípido, como el descrito en WO 90/10448. El complejo oligonucleótido sentido o antisentido-lípido se disocia preferiblemente dentro de la célula por medio de una lipasa endógena.

#### *Uso de polipéptidos de la TSLP humana y de polipéptidos fragmentados*

Los usos incluyen, pero no se limitan a, lo siguiente:

- Purificación de proteínas y medición de la actividad de las mismas.
- Agentes de suministro.
- Reactivos Terapéuticos y de Investigación.
- Marcadores de peso molecular y de enfoque isoelectrico.

- Controles para fragmentación de péptidos.
- Identificación de proteínas desconocidas.
- Preparación de Anticuerpos.

#### Reactivos de Purificación

El polipéptido de la invención encuentra uso como reactivo de purificación de proteína. Por ejemplo, el polipéptido se puede utilizar para purificar compañeros de enlazamiento de TSLP, tales como los receptores de TSLP humana. En modalidades particulares, un polipéptido (en cualquiera de las formas descritas aquí que sea capaz de enlazar receptores de TSLP) se une a un soporte sólido por medio de procedimientos convencionales. Como ejemplo, están disponibles columnas de cromatografía de afinidad que contiene grupos funcionales que reaccionarán con grupos funcionales sobre cadenas laterales de aminoácidos de proteínas (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ). En una alternativa, se une un polipéptido de TSLP/proteína Fc (como se discutió anteriormente), a columnas de cromatografía que contienen Proteína A o Proteína G a través de la interacción con la fracción de Fc.

El polipéptido también encuentra uso en la purificación o identificación de células que expresan a los receptores de TSLP sobre la superficie de la célula. Los polipéptidos se enlazan a una fase sólida tal como a una matriz de una columna cromatográfica o a un sustrato similar adecuado, por ejemplo, se pueden recubrir microesferas magnéticas con los polipéptidos y mantenerlas en un vaso de incubación a través de un campo magnético. Se ponen en contacto las suspensiones de mezclas de células que contienen a las células que expresan al receptor de TSLP con la fase sólida que tiene a los polipéptidos sobre ella. Las células que expresan al receptor de TSLP sobre la superficie de la célula se enlazan a los polipéptidos fijos, y se lavan luego las células no enlazadas.

Alternativamente, se pueden conjugar los polipéptidos a una fracción detectable, luego incubarlos con las células que van a ser analizadas por la expresión del receptor de TSLP. Después de la incubación, se renueva la materia marcada no enlazada y se determina la presencia o la ausencia de la fracción detectable sobre las células.

En una alternativa adicional, se incuban las mezclas de células sospechosas de contener receptores de TSLP con polipéptidos biotinilados. Los períodos de incubación son típicamente al menos de una hora de duración para garantizar enlazamiento suficiente. Se pasa luego la mezcla resultante a través de una columna empacada con perlas recubiertas con avidina, con lo cual la alta afinidad de la biotina por la avidina permite el enlazamiento de las células deseadas a las perlas. Los procedimientos para utilizar las perlas recubiertas con avidina son conocidos (ver, Berenson, y colaboradores, *J. Cell. Biochem.*, 10D:239 (1986)). El lavado para remover el material no enlazado, y la liberación de las células enlazadas, se lleva a cabo utilizando métodos convencionales.

#### Medición de la Actividad

Los polipéptidos también encuentran uso en la medición de la actividad biológica de los receptores de la TSLP en términos de su afinidad de enlazamiento. Se pueden emplear entonces los polipéptidos para aquellos estudios que conducen al "aseguramiento de la calidad", por ejemplo, para monitorear la vida en estantería y la estabilidad de la proteína bajo condiciones diferentes. Por ejemplo, se pueden emplear los polipéptidos en un estudio de afinidad de enlazamiento para medir la actividad biológica del receptor de TSLP que ha sido almacenado a diferentes temperaturas o producido en diferentes tipos de células. También se pueden utilizar las proteínas para determinar si se retiene la actividad biológica después de la modificación de un receptor de TSLP (por ejemplo, modificación química, truncamiento, mutación, etc.). La afinidad de enlazamiento del receptor modificado de TSLP se compara con aquella de un receptor no modificado de TSLP para detectar cualquier impacto adverso de las modificaciones sobre la actividad biológica de los receptores de TSLP. Se puede averiguar entonces la actividad biológica de un receptor de TSLP antes de utilizarlo en un estudio de investigación, por ejemplo.

#### Agentes de Suministro

Los polipéptidos también encuentran uso como portadores para agentes de suministro unidos a ellos con células que soportan a los receptores de TSLP. Las células que expresan a los receptores de TSLP incluyen a aquellas identificadas en el timo, el bazo, el riñón y la médula ósea. Por lo tanto, los polipéptidos pueden ser utilizados para suministrar agentes terapéuticos o de diagnóstico a tales células (o a otros tipos de células que se ha encontrado que expresan a los receptores de TSLP sobre la superficie de la célula) en procedimientos *in vitro* o *in vivo*.

Los agentes terapéuticos y detectables (de diagnóstico) que se pueden unir a un polipéptido incluyen, pero no se limitan a, toxinas, otros agentes citotóxicos, drogas, radionúclidos, cromóforos, enzimas que catalizan una reacción colorimétrica o fluorométrica, y similares, siendo el agente particular escogido de acuerdo a la aplicación pretendida. Entre las toxinas están las toxinas ricina, abrina, de la difteria, endotoxina A d *Pseudomonas aeruginosa*, proteínas ribosomales inactivantes, micotoxinas tales como tricotecenas, y derivados y fragmentos (por ejemplo, cadenas sencillas) de los mismos. Los radionúclidos adecuados para uso diagnóstico incluyen, pero no se limitan a, <sup>123</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>99m</sup>Tc, <sup>111</sup>In, y <sup>76</sup>Br. Ejemplos de radionúclidos adecuados para uso terapéutico son <sup>131</sup>I, <sup>211</sup>At, <sup>77</sup>Br, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>212</sup>Pb, <sup>212</sup>Bi, <sup>109</sup>Pd, <sup>64</sup>Cu, y <sup>67</sup>Cu.

Tales agentes se pueden unir al polipéptido por medio de cualquier procedimiento convencional adecuado. El polipéptido contiene grupos funcionales sobre las cadenas laterales de aminoácidos que pueden reaccionar con grupos funcionales sobre un agente deseado para formar enlaces covalentes, por ejemplo. Alternativamente, se pueden derivatizar la proteína o el agente para generar o unir un grupo funcional reactivo deseado. La derivatización puede involucrar la unión de uno de los reactivos bifuncionales de acoplamiento disponibles para unir diferentes moléculas a proteínas (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois). Se conocen un gran número de técnicas para marcar proteínas en forma radioactiva. Metales radionúclidos se pueden unir a polipéptidos por medio del uso de un agente adecuado de quelación bifuncional, por ejemplo.

Se preparan entonces conjugados que comprenden polipéptidos y un agente terapéutico adecuado o de diagnóstico (preferiblemente covalentemente enlazado). Los conjugados se administran o bien se emplean en una cantidad apropiada para la aplicación particular.

#### *Agentes Terapéuticos*

Los polipéptidos de la invención se pueden utilizar en el desarrollo de tratamientos para cualquier trastorno mediado (directa o indirectamente) por cantidades deficientes o insuficientes de los polipéptidos. Estos polipéptidos se pueden administrar a un mamífero afligido con un trastorno de esta clase.

Los polipéptidos se pueden emplear también en la inhibición de la actividad biológica de los receptores de TSLP en procedimientos *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, se puede utilizar un polipéptido purificado o modificado o un fragmento del mismo (por ejemplo, polipéptidos modificados de TSLP que se enlazan al receptor pero que carecen de la habilidad para inducir señalización) para inhibir el enlazamiento de TSLP endógeno con receptores de la superficie de la célula. Se inhiben por lo tanto los efectos biológicos que resultan del enlazamiento de TSLP endógena con receptores.

Además, se pueden administrar polipéptidos receptores de TSLP a un mamífero para tratar un trastorno mediado por el receptor de TSLP. Tales trastornos mediados por el receptor de TSLP incluyen condiciones causadas (directa o indirectamente) o exacerbadas por receptores de TSLP.

Las composiciones de la presente invención pueden contener un polipéptido en cualquiera de las formas descritas aquí, tal como proteínas nativas, variantes, derivados, oligómeros, y fragmentos biológicamente activos. En modalidades particulares, la composición comprende un polipéptido soluble de TSLP o un oligómero comprende polipéptidos de TSLP.

Se proveen aquí composiciones que contienen una cantidad efectiva de un polipéptido de la presente invención, en combinación con otros componentes tal como diluyentes, portadores, o excipientes. Los polipéptidos se pueden formular de acuerdo a métodos conocidos utilizados para preparar composiciones útiles farmacéuticamente aceptables. Ellos se pueden combinar en una mezcla, ya sea del material activo solo o con otros materiales activos conocidos adecuados para una indicación dada, con diluyentes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, solución salina, Tris-HCl, soluciones de acetato y amortiguadas con fosfato), preservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), emulgentes, solubilizantes, adyuvantes y/o portadores. Las formulaciones adecuadas para composiciones farmacéuticas incluyen a aquellas descritas en (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16<sup>ava</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1980)).

Además, tales composiciones pueden acomplejarse con polietilén glicol (PEG), iones metálicos, o incorporarse en compuestos poliméricos tales como ácido poliacético, ácido poliglicólico, hidrogeles, dextrano, etc., o incorporarse en liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilaminares o multilaminares, imágenes de eritrocitos o esferoblastos. Tales composiciones influirán el estado físico, solubilidad, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo*, y velocidad de aclaramiento *in vivo*, y se escogen por lo tanto de acuerdo con la aplicación pretendida.

Las composiciones de la invención se pueden administrar en cualquier forma adecuada, por ejemplo, en forma tópica, en forma parenteral, o por inhalación. El término "parenteral" incluye inyección, por ejemplo por vía subcutánea, intravenosa, o intramuscular, también incluyen administración localizada, por ejemplo, en un sitio de enfermedad o lesión. La liberación sostenida a partir de implantes está contemplada también. Alguien capacitado en el arte pertinente reconocerá que las dosis adecuadas variarán, dependiendo de factores tales como la naturaleza del trastorno que va a ser tratado, del peso corporal del paciente, la edad, y de la condición general, y de la vía de administración. Las dosis preliminares se pueden determinar de acuerdo con las pruebas en animales, y el escalado de dosis para administración en humanos se lleva a cabo de acuerdo con prácticas aceptadas en el arte.

También se contemplan las composiciones que contienen ácidos nucleicos en formulaciones fisiológicamente aceptables. El ADN se puede formular por medio de inyección, por ejemplo.

#### *Agentes para Investigación*

Otro uso del polipéptido de la presente invención es como herramienta de investigación para estudiar los efectos biológicos que resultan de inhibir las interacciones TSLP/receptor de TSLP sobre diferentes tipos de células. También se pueden emplear polipéptidos en ensayos *in vitro* para detectar TSLP o a los receptores de TSLP o a las interacciones de los mismos.

Otra modalidad de la invención se relaciona con los usos de TSLP humana para estudiar la transducción de señal de células B o de células T. La TSLP humana y otras citoquinas juegan un papel central en el desarrollo de las células B y de las células T y en las respuestas inmunológicas, incluidas las señales de transducción celular, estimulación de células para secretar citoquinas, e inducir la proliferación de células B y de células T. Como tal, las alteraciones en la expresión y/o la activación de TSLP pueden tener profundos efectos sobre una plétora de procesos celulares, incluyendo, pero sin limitarse a, la activación o inhibición de respuestas específicas de la célula y proliferación. La expresión de TSLP clonada o de mutantes catalíticamente inactivos de TSLP ha sido utilizada para identificar el papel que juega una proteína particular en la mediación de eventos de señalación específicos.

La señalación secular a menudo involucra una cascada de activación molecular, durante la cual un receptor propaga una señal mediada por el receptor del ligando por medio de la activación específica de quinasas intracelulares que fosforilan a sustratos objetivo. Estos sustratos pueden ser por sí mismos quinasas que llegan a activarse después de la fosforilación. Alternativamente, pueden ser moléculas adaptadoras que facilitan la señalización secuencia abajo a través de la interacción proteína-proteína después de la fosforilación. Independientemente de la naturaleza de la(s) molécula(s) de sustrato, se pueden utilizar versiones activas catalíticamente expresadas de los receptores del ligando de TSLP para identificar qué sustrato(s) fue(ron) reconocido(s) y activado(s) por el (los) receptor(es) del ligando de TSLP. Como tal, estos nuevos receptores de TSLP se pueden utilizar como reactivos para identificar moléculas nuevas involucradas en las rutas de transducción de la señal.

Además, alguien capacitado en el arte puede utilizar TSLP utilizando técnicas conocidas para estimular la proliferación de células de linaje B o de linaje T (Ray y colaboradores, *Eur. J. Immunology* 26, 10-16 (1996)) y (Namikawa y colaboradores, *Blood* 87:1881-1890 (1996)), para la expresión del clon del receptor de TSLP humana (Sims y colaboradores, *Science* 241:585-589 (1988)), para clonar una proteína relacionada (Kozlosky y colaboradores, *Cytokine* 9:540-549 (1997)) y (Lyman y colaboradores, *Blood* 10:2795-2801 (1994)), y para expandir células *ex vivo* (Piacibello y colaboradores, *Blood* 89:2644-2653 (1997)).

#### *Usos de los Mismos*

Por lo tanto, la presente invención abarca métodos para estimular la proliferación de linfocitos B y linfocitos T, donde el método comprende incubar linfocitos con TSLP humana. En una modalidad adicional, el método comprende incubar linfocitos con TSLP humana y al menos otra citoquina *in vivo* o *in vitro*. Preferiblemente, la citoquina se selecciona del grupo de IL-7, Factor de Acero, Factor de Célula Madre, Factor de Crecimiento de Mastocitos o Ligando flt3. Más preferiblemente, la citoquina es IL-7.

La presente invención también abarca métodos para estimular el desarrollo de linfocitos o limfopoyesis, donde el método comprende incubar células progenitoras, tales como células mononucleares derivadas de la célula ósea, con TSLP humana *in vivo* o *in vitro*. En una modalidad adicional, el método comprende incubar linfocitos con TSLP humana y al menos otra citoquina. Preferiblemente, la citoquina se selecciona del grupo de IL-7, Factor de Acero, Factor de Célula Madre, Factor de Crecimiento de Mastocitos o Ligando flt3. Más preferiblemente, la citoquina es IL-7.

#### *Marcadores de Punto Isoeléctrico y de Peso Molecular*

Los polipéptidos de la presente invención se pueden someter a fragmentación para producir péptidos más pequeños por medios químicos y enzimáticos, y se pueden utilizar los fragmentos de péptido así producidos en el análisis de otras proteínas o polipéptidos. Por ejemplo, se pueden utilizar tales fragmentos de péptidos como marcadores de peso molecular de péptidos, marcadores de punto isoelectrico de péptidos, o en el análisis del grado de fragmentación de los péptidos. Por lo tanto, la invención también incluye a estos polipéptidos y a los fragmentos de péptido, así como los kits para ayudar en la determinación del peso molecular aparente y del punto isoelectrico de una proteína desconocida, y kits para evaluar el grado de fragmentación de una proteína desconocida.

Aunque todos los métodos de fragmentación son abarcados por la invención, la fragmentación química es una modalidad preferida, e incluye el uso de bromuro de cianógeno para romper bajo condiciones neutras o ácidas de tal manera que ocurra una escisión específica en los residuos de metionina (E. Gross, *Methods in Enz.* 11:238-255 (1967)). Esto puede incluir además etapas adicionales, tales como una etapa de carboximetilación para convertir residuos de cisteína en una especie no reactiva.

La fragmentación enzimática es otra modalidad preferida, e incluye el uso de una proteasa tal como Asparaginilendo peptidasa, Arginilendo peptidasa, Acromobacter proteasa I, Tripsina, proteasa V8 de *Staphylococcus aureus*, Endoproteinasa Asp-N, o Endoproteinasa Lys-C bajo condiciones convencionales para resultar en la escisión en residuos de aminoácidos específicos. La Asparaginilendo peptidasa puede escindir específicamente sobre el costado del carboxilo de los residuos de asparagina presentes dentro de los polipéptidos de la invención. La Acromobacter proteasa I puede escindir específicamente sobre el costado del carboxilo de los residuos de lisina presentes dentro de los polipéptidos (Sakiyama y Nakat, patente estadounidense No. 5.248.599; T. Masaki y colaboradores, *Biochim. Biophys. Acta* 660:44-50 (1981); T. Masaki y colaboradores, *Biochim. Biophys. Acta* 660:51-55 (1981)). La tripsina puede escindir específicamente sobre el costado del carboxilo de los residuos de arginina y de lisina presentes dentro de los polipéptidos de la invención. La fragmentación enzimática puede ocurrir también con una proteasa que escinde en múltiples residuos de aminoácidos. Por ejemplo, la proteasa V8 de *Staphylococcus aureus* puede escindir específicamente

sobre el costado del carboxilo de los residuos de ácido aspártico y glutámico presentes dentro de los polipéptidos (D. W. Cleveland, *J. Biol. Chem.* 3:1102-1106 (1977)). La Endoproteinasa Asp-N puede escindir específicamente sobre el costado amino de los residuos de asparagina presentes dentro de los polipéptidos. La Endoproteinasa Lys-C puede escindir específicamente sobre el costado del carboxilo de los residuos de lisina presentes dentro de los polipéptidos de la invención. Otros tratamientos enzimáticos y químicos pueden ser usados igualmente para fragmentar específicamente estos polipéptidos en un juego único de péptidos específicos.

Desde luego, los péptidos y fragmentos de los polipéptidos de la invención también se pueden producir por medio de procesos recombinantes convencionales y procesos de síntesis conocidos en el arte. Con relación a los procesos recombinantes, los péptidos y fragmentos de péptidos abarcados por la invención pueden tener pesos moleculares variables, dependiendo de la célula huésped en la cual se expresen. La glicosilación de polipéptidos y de fragmentos de péptido de la invención en diferentes tipos de células puede resultar en variaciones del peso molecular de estos pedazos, dependiendo del grado de modificación. El tamaño de estos pedazos puede ser más heterogéneo con fragmentos de polipéptido derivados de la porción extracelular del polipéptido. Se pueden obtener polipéptidos y fragmentos de péptido consistentes por medio del uso de polipéptidos completamente derivados de las regiones transmembrana y citoplasmática, pretratando con N-glicanasa para remover la glicosilación, o expresando los polipéptidos en los huéspedes bacterianos.

También se puede variar el peso molecular de estos polipéptidos por medio de la fusión de secuencias adicionales de péptido a ambos extremos amino y carboxilo terminales de polipéptidos de la invención. Las fusiones de secuencias adicionales de péptido en los extremos amino y carboxilo terminales de polipéptidos de la invención pueden ser utilizadas para reforzar la expresión de estos polipéptidos o ayudaren la purificación de la proteína. Además, las fusiones de secuencias adicionales de péptido en los extremos amino y carboxilo terminales de polipéptidos de la invención alterarán algo, pero usualmente no todo, de los péptidos fragmentados de los polipéptidos generados por tratamiento enzimático o químico. Desde luego, se pueden introducir mutaciones en los polipéptidos de la invención utilizando técnicas conocidas y de rutina de biología molecular. Por ejemplo, se puede diseñar una mutación a fin de eliminar un sitio de escisión proteolítica por medio de una enzima específica o un sitio de escisión por medio de un procedimiento específico de fragmentación químicamente inducido. La eliminación del sitio alterará la huella peptídica de los polipéptidos de la invención por fragmentación con la enzima específica o por procedimiento químico.

Los polipéptidos y los péptidos fragmentados resultantes se pueden analizar por medio de métodos que incluyen sedimentación, electroforesis, cromatografía, y espectrometría de masas para determinar sus pesos moleculares. Ya que la única secuencia de aminoácidos de cada pedazo específica un peso molecular, estos pedazos pueden servir después como marcadores de peso molecular utilizando tales técnicas de análisis para ayudar en la determinación del peso molecular de una proteína desconocida, polipéptidos o fragmentos de los mismos. Los marcadores de peso molecular de la invención sirven particularmente bien como marcadores de peso molecular para la estimación del peso molecular aparente de proteínas que tiene pesos moleculares aparentes similares y, en consecuencia, permiten una mayor precisión en la determinación del peso molecular aparente de las proteínas.

Cuando la invención se relaciona con el uso de marcadores de peso molecular de un péptido fragmentado, esos marcadores tienen preferiblemente al menos un tamaño de 10 aminoácidos. Más preferiblemente, esos marcadores de peso molecular de péptido fragmentado tienen un tamaño entre 10 y 100 aminoácidos. Aún más preferibles son los marcadores de peso molecular de péptido fragmentado tienen un tamaño entre 10 y 50 aminoácidos y especialmente un tamaño entre 10 y 35 aminoácidos. Lo más preferible son los marcadores de peso molecular de péptido fragmentado con un tamaño entre 10 y 20 aminoácidos.

Entre los métodos para determinar el peso molecular están la sedimentación, la electroforesis sobre gel, la cromatografía y la espectrometría de masas. Una modalidad particularmente preferida es la electroforesis desnaturante sobre gel de poliacrilamida (U. K. Laemmli, *Nature* 227:680-685 (1970)). Convencionalmente, el método utiliza dos sendas separadas de un gel que contiene dodecil sulfato de sodio y una concentración de acrilamida entre 6-20%. La habilidad para resolver simultáneamente al marcador y a la muestra bajo idénticas condiciones permite una mayor precisión. Por su puesto se entiende, que se pueden utilizar muchas técnicas diferentes para la determinación del peso molecular de una proteína desconocida utilizando polipéptidos de la invención, y que esta modalidad no limita de ninguna manera el alcance de la invención.

Cada polipéptido no glicosilado o fragmento del mismo tiene un *pI* que se determina intrínsecamente por medio de su única secuencia de aminoácidos (cuyo *pI* lo puede estimar el operario calificado utilizando cualquiera de los programas de computador diseñados para predecir los valores de *pI* actualmente disponibles, calculados utilizando cualquier tabla conocida de *pKa* para aminoácidos o medido empíricamente). Por lo tanto, estos polipéptidos y fragmentos de los mismos pueden servir como marcadores específicos para ayudar en la determinación del punto isoelectrico de una proteína desconocida, polipéptido, o péptido fragmentado utilizando técnicas tales como el enfoque isoelectrico. Estos marcadores de polipéptido o de péptido fragmentado sirven particularmente bien para la estimación de los puntos isoelectricos aparentes de proteínas desconocidas que tienen puntos isoelectricos aparentes cercanos a aquellos de los marcadores de polipéptido o péptido fragmentado de la invención.

La técnica de enfoque isoelectrico se puede combinar además con otras técnicas tales como la electroforesis sobre gel para separar simultáneamente una proteína con base en el peso molecular y la carga. La habilidad para resolver simultáneamente estos marcadores de polipéptido o de péptido fragmentado y la proteína desconocida bajo idénticas

condiciones permite una mayor precisión en la determinación del punto isoelectrico aparente de la proteína desconocida. Esto es de particular interés en técnicas, tales como la electroforesis en dos dimensiones (T.D. Brock y M.T. Madigan, *Biology of Microorganisms* 76-77, Prentice Hall, 6d ed. (1991)), donde la naturaleza del procedimiento dicta que cualquiera de los marcadores debe ser resuelto simultáneamente con la proteína desconocida. Además, con tales métodos, estos polipéptidos y los péptidos fragmentados de los mismos pueden ayudar en la determinación tanto del punto isoelectrico como del peso molecular de una proteína desconocida o péptido fragmentado.

Los polipéptidos y péptidos fragmentados se pueden visualizar utilizando dos métodos diferentes que permiten una discriminación entre la proteína desconocida y los marcadores de peso molecular. En una modalidad, los marcadores de peso molecular del polipéptido y del péptido fragmentado de la invención se pueden visualizar utilizando anticuerpos generados contra estos marcadores y técnicas convencionales de inmunotransferencia. Esta detección se lleva a cabo bajo condiciones convencionales que no resultan en la detección de la proteína desconocida. Se entiende que puede que no sea posible generar anticuerpos contra todos los fragmentos de polipéptido de la invención, ya que los péptidos pequeños pueden no contener epítomos inmunógenos. Se entiende además que no todos los anticuerpos trabajaran en este ensayo; sin embargo, aquellos anticuerpos que son capaces de enlazar polipéptidos y fragmentos de la invención se pueden determinar fácilmente utilizando técnicas convencionales.

La proteína desconocida se visualiza también por medio del uso de un procedimiento convencional de coloración. El exceso molar de proteína desconocida para los marcadores de peso molecular del polipéptido o del péptido fragmentado de la invención es tal que el procedimiento convencional de coloración detecta predominantemente la proteína desconocida. El nivel de estos marcadores de peso molecular del polipéptido o del péptido fragmentado es tal que permite una pequeña detección o ninguna detección de estos marcadores por medio del método convencional de coloración. El exceso molar preferido de proteína desconocida con respecto a los marcadores de peso molecular del polipéptido de la invención está entre 2 y 100.000 veces. Más preferiblemente, el exceso molar preferido de la proteína desconocida con respecto a estos marcadores de peso molecular del polipéptido está entre 10 y 10.000 veces y especialmente entre 100 y 1000 veces.

Se entiende por su puesto que se pueden utilizar muchas técnicas para la determinación y la detección del peso molecular y del punto isoelectrico de una proteína desconocida, de polipéptidos, y de péptidos fragmentados de los mismos utilizando estos marcadores de peso molecular del polipéptido y fragmentos de péptido del mismo, y que estas modalidades no limitan de ninguna manera el alcance de la invención.

En otra modalidad, los análisis de la fragmentación progresiva de los polipéptidos de la invención en péptidos específicos (D. W. Cleveland y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 252:1102-1106 (1977)), tal como por medio de la alteración del tiempo o de la temperatura de la reacción de fragmentación, se pueden utilizar como un control para el grado de escisión de una proteína desconocida. Por ejemplo, la escisión de la misma cantidad de polipéptido y de proteína desconocida bajo idénticas condiciones puede permitir una comparación directa del grado de fragmentación. Las condiciones que resultan en la fragmentación completa del polipéptido pueden también resultar en la fragmentación completa de la proteína desconocida.

Como para el uso específico de los polipéptidos y péptidos fragmentados de la invención como marcadores de peso molecular, la fragmentación del polipéptido de la SEQ ID NO: 2 con bromuro de cianógeno genera un juego único de marcadores de peso molecular de péptido fragmentado. La distribución de residuos de metionina determina el número de aminoácidos en cada péptido y la composición única de aminoácidos de cada péptido determina su peso molecular.

Además, el polipéptido purificado preferido de la invención (SEQ ID NO: 2) tiene un peso molecular observado aproximadamente de 21.000 Daltons.

Donde se utiliza una proteína intacta, el uso de estos marcadores de peso molecular de polipéptido permite una mayor precisión en la determinación del peso molecular aparente de proteínas que tienen pesos moleculares aparentes cercanos a 21.000 Daltons. Donde se utilizan los fragmentos, existe una mayor precisión en la determinación del peso molecular sobre el rango de los pesos moleculares del fragmento.

Finalmente, como para los kits que son abarcados por la invención, los constituyentes de tales kits se pueden variar, pero típicamente contienen a los marcadores de peso molecular del polipéptido y del péptido fragmentado. También, tales kits pueden contener a los polipéptidos en donde un sitio necesario para fragmentación ha sido removido. Además, los kits pueden contener reactivos para la escisión específica del polipéptido y la proteína desconocida por medio de escisión química o enzimática. Los kits pueden contener además anticuerpos dirigidos contra polipéptidos o fragmentos de los mismos de la invención.

#### *Identificación de Proteínas Desconocidas*

Como se expuso anteriormente, se puede ingresar un polipéptido o una huella digital de un péptido en una base de datos o compararlos con una base de datos de proteínas conocidas para ayudar en la identificación de una proteína desconocida utilizando espectrometría de masas (W.J. Henzel y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5011-5015 (1993); D. Fenyo y colaboradores, *Electrophoresis*, 19:998-1005 (1998)). Una variedad de programas de computador para facilitar estas comparaciones se encuentran accesibles a través de Internet, tales como Protein Prospector (sitio en Internet: [prospector.uscf.edu](http://prospector.uscf.edu)), Multident (sitio en Internet: [www.expasy.ch/sprot/multiident.html](http://www.expasy.ch/sprot/multiident.html)), PeptideSearch

(sitio en Internet: [www.mann.embl-heidelberg.de...deSearch/FR\\_PeptideSearch Form.html](http://www.mann.embl-heidelberg.de...deSearch/FR_PeptideSearch Form.html)), y ProFound (sitio en Internet: [www.chaitsg.rockefeller.edu/cgi-bin/protid-frag.html](http://www.chaitsg.rockefeller.edu/cgi-bin/protid-frag.html)). Estos programas le permiten al usuario especificar el agente de escisión y los pesos moleculares de los péptidos fragmentados dentro de una tolerancia determinada. Los programas comparan estos pesos moleculares con las bases de datos de proteína para ayudar a determinar la identidad de la proteína desconocida.

Además, las digestiones de péptidos de proteínas desconocidas se pueden secuenciar utilizando espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y la secuencia resultante buscada contra las bases de datos (J.K. Eng, y colaboradores, *J. Am. Soc. Mass Spec.* 5:976-989 (1994); M. Mann y M. Wilm, *Anal. Chem.*, 66:4390-4399 (1994); J.A. Taylor y R.S. Johnson, *Rapid Comm. Mass Spec.*, 11:1067-1075 (1997)). Los programas de búsqueda que se pueden utilizar en este proceso se encuentran en la Internet, tales como Lutefisk 97 (sitio en Internet: [www.lsb.com:70/Lutefisk97.html](http://www.lsb.com:70/Lutefisk97.html)), y los programas Protein Prospector, Peptide Search y ProFound descritos anteriormente. Por lo tanto, la adición de la secuencia de un gen y su secuencia proteínica predicha y los fragmentos del péptido a una base de datos de secuencia puede ayudar en la identificación de proteínas desconocidas utilizando espectrometría de masas en tándem.

### Anticuerpos

Se proveen aquí anticuerpos que son inmunoreactivos con los polipéptidos de la invención. Tales anticuerpos se enlazan específicamente a los polipéptidos a través de los sitios de enlazamiento del antígeno de anticuerpo (en forma opuesta al enlazamiento no específico). Por lo tanto, los polipéptidos, fragmentos, variantes, proteínas de fusión, etc., como se expuso anteriormente, se pueden emplear como "inmunógenos" en la producción de anticuerpos inmunoreactivos con estos. Más específicamente, los polipéptidos, fragmentos, variantes, proteínas de fusión, etc., contienen determinantes antigénicos o epítopos que producen la formación de anticuerpos.

Estos determinantes antigénicos o epítopos pueden ser o bien lineales o conformacionales (discontinuos). Los epítopos lineales se componen de una sección única de aminoácidos del polipéptido, mientras que los epítopos conformacionales o discontinuos se componen de secciones de aminoácidos de diferentes regiones de la cadena del polipéptido que son traídas muy cerca sobre el pliegue de la proteína (C. A. Janeway, Jr. y P. Travers, *Immuno Biology* 3:9, Garland Publishing Inc., 2<sup>da</sup> ed. (1996)). Debido a que las proteínas plegadas tienen superficies complejas, el número de epítopos disponibles es muy numeroso; sin embargo, debido a la conformación de la proteína y de los impedimentos estéricos, el número de anticuerpos que realmente se enlaza a los epítopos es menor que el número de epítopos disponible (C. A. Janeway, Jr. y P. Travers, *Immuno Biology* 2:14, Garland Publishing Inc., 2<sup>da</sup> ed. (1996)). Los epítopos pueden ser identificados por medio de cualquiera de los métodos conocidos en el arte.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se relaciona con los epítopos antigénicos de los polipéptidos de la invención. Tales epítopos son útiles para elevar los anticuerpos, en particular los anticuerpos monoclonales, como se describe con más detalle más adelante. Adicionalmente, los epítopos de los polipéptidos de la invención se pueden utilizar como reactivos de investigación, en ensayos y para purificar anticuerpos de enlazamiento específico de sustancias tales como sueros policlonales o sobrenadantes de hibridomas cultivados. Tales epítopos o variantes de los mismos se pueden producir utilizando técnicas conocidas en el arte tal como la síntesis en fase sólida, escisión química o enzimática de un polipéptido, o utilizando tecnología de ADN recombinante.

Como para los anticuerpos que pueden ser producidos por los epítopos de los polipéptidos de la invención, ya sea que los epítopos hayan sido aislados o que permanezca parte de los polipéptidos, tanto los anticuerpos policlonales como monoclonales se pueden preparar por medio de técnicas convencionales. Ver, por ejemplo (Kennet y colaboradores, *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, eds., Plenum Press, New York (1980); y Harlow y Land, *Antibodies: A Laboratory Manual*, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988)).

Las líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales específicos para los polipéptidos de la invención también son contempladas aquí. Tales hibridomas se pueden producir e identificar por medio de técnicas convencionales. Un método para producir tales líneas celulares de hibridoma comprende la inmunización de un animal con un polipéptido; recoger las células del bazo del animal inmunizado; fusionar dichas células del bazo a una línea celular de mieloma, generando así células de hibridoma; e identificar una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que enlaza al polipéptido. Los anticuerpos monoclonales se pueden recuperar por medio de técnicas convencionales.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, por ejemplo, versiones humanizadas de anticuerpos monoclonales murinos. Tales anticuerpos humanizados se pueden preparar por medio de técnicas conocidas y ofrecen la ventaja de una inmunogenicidad reducida cuando se administran los anticuerpos a humanos. En una modalidad, un anticuerpo monoclonal humanizado comprende la región variable de un anticuerpo murino (o justamente el sitio de enlazamiento del antígeno del mismo) y una región constante derivada de un anticuerpo humano. Alternativamente, un fragmento de anticuerpo humanizado puede contener al sitio de enlazamiento del antígeno de un anticuerpo monoclonal murino y un fragmento de región variable (que carece del sitio de enlazamiento del antígeno) derivado de un anticuerpo humano. Los procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales quiméricos y además modificados por ingeniería genética incluyen a aquellos descritos en (Riechmann y colaboradores, *Nature* 332:323 (1988), Liu y colaboradores, *PNAS* 84:3439 (1987), Larrick y colaboradores, *BioTechnology* 7:934 (1989), y Winter y Harris, *TIPS* 14:139 (Mayo 1993)). Se pueden encontrar procedimientos para generar anti-

cuerpos transgénicamente en GB 2.272.440, en las patentes estadounidenses Nos. 5.569.825 y 5.545.806 y en patentes relacionadas que reivindiquen prioridad de las mismas.

Los fragmentos de enlazamiento del antígeno de los anticuerpos, que pueden ser producidos por medio de técnicas convencionales, son también abarcados por la presente invención. Los ejemplos de tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>. También se proveen fragmentos de anticuerpo y derivados producidos por medio de técnicas de ingeniería genética.

En una modalidad, los anticuerpos son específicos para los polipéptidos de la presente invención y no reaccionan en forma cruzada con otras proteínas. Los procedimientos de selección por medio de los cuales se pueden identificar tales anticuerpos son conocidos, y pueden involucrar cromatografía de inmunoafinidad, por ejemplo.

#### *Usos de los Mismos*

Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar en ensayos para detectar la presencia de los polipéptidos o fragmentos de la invención, ya se *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos se pueden emplear también en la purificación de polipéptidos o de fragmentos de la invención por medio de cromatografía de inmunoafinidad.

Aquellos anticuerpos que adicionalmente pueden bloquear el enlazamiento de los polipéptidos de la invención a los receptores de TSLP se pueden utilizar para inhibir una actividad biológica que resulta de tal enlazamiento. Tales anticuerpos bloqueadores se pueden identificar utilizando cualquier procedimiento adecuado de análisis, tal como por medio del análisis de los anticuerpos por la habilidad para inhibir el enlazamiento de TSLP a ciertas células que expresan a los receptores de TSLP. Ejemplos de tales células son las líneas celulares linfoides B y T 70Z/3 y 7B9, respectivamente. Alternativamente, los anticuerpos bloqueadores se pueden identificar en ensayos para la habilidad de inhibir un efecto biológico que resulte del enlazamiento de TSLP a receptores de TSLP sobre células objetivo. Los anticuerpos se pueden analizar por la habilidad para inhibir la destrucción de las células mediada por TSLP que expresan los receptores de TSLP, por ejemplo.

Tal anticuerpo se puede emplear en un procedimiento *in vitro*, o ser administrado *in vivo* para inhibir una actividad biológica mediada por la entidad que generó el anticuerpo. Se pueden tratar así los trastornos causados o exacerbados (directa o indirectamente) por la interacción de TSLP con los receptores de TSLP sobre la superficie de la célula. Un método terapéutico involucra la administración *in vivo* de un anticuerpo bloqueador a un mamífero en una cantidad efectiva en la inhibición de la actividad biológica mediada por TSLP. Se prefiere generalmente el uso de anticuerpos monoclonales en tales métodos terapéuticos. En una modalidad, se emplea un fragmento de anticuerpo para enlazamiento del antígeno.

Los anticuerpos se pueden seleccionar por las propiedades agonistas (esto es, imitación del ligando). Tales anticuerpos, por el enlazamiento a los receptores de TSLP sobre la superficie de la célula, inducen efectos biológicos (por ejemplo, la transducción de señales biológicas) similares a los efectos biológicos inducidos cuando TSLP se enlaza a los receptores de TSLP sobre la superficie de la célula. Los anticuerpos agonistas se pueden utilizar para inducir proliferación celular de linaje B o de linaje T.

Se proveen aquí composiciones que comprenden un anticuerpo que está dirigido contra TSLP humano, y un diluyente, excipiente, o portador fisiológicamente aceptable. Los componentes adecuados de tales composiciones son como se describió anteriormente para composiciones que contienen proteínas TSLP humanas.

También se proveen aquí conjugados que contienen un agente detectable (por ejemplo, diagnóstico) o terapéutico, unido al anticuerpo. Ejemplos de tales agentes se presentaron anteriormente. Los conjugados encuentran uso en procedimientos *in vitro* o *in vivo*.

Los ejemplos siguientes se presentan para ilustrar más modalidades particulares de la invención, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

#### *Ejemplo 1*

##### *Aislamiento del Ácido Nucleico*

Se obtuvo una secuencia de ácido nucleico de TSLP humana por medio de la secuenciación del clon 1407260 de EST IMAGE, con acceso # AA889581. Esta secuencia sugirió, en comparación con la secuencia TSLP murina, que el clon EST era un clon parcial. Se seleccionaron un cierto número de bibliotecas de ADNc con iniciadores internos para determinar una fuente de ADNc que pudiera ser utilizada para obtener al extremo 3' perdido del clon de ADNc de TSLP. Después de 60 ciclos de PCR utilizando dos iniciadores internos de la secuencia de TSLP humana, fueron positivas las siguientes bibliotecas de ADNc para secuencias de TSLP: testículo humano, fibroblastos de prepucio humano y cerebro fetal (débilmente positivo); mientras que MoT, HS431, médula ósea, HPT4, HBT3, W126, Hut102, PBT, Sk Hep, fibroblastos dérmicos humanos, Raji, placenta humana, y bibliotecas KB fueron todos negativos.

Utilizando PCR sobre la biblioteca  $\lambda$ gt10 de testículo humano con un iniciador interno de TSLP y un iniciador del vector de  $\lambda$ gt10, se aislaron dos clones (19E y 19F) con secuencias idénticas a las secuencias internas de TSLP humana.

Ambos clones tenían extremos 5' idénticos pero extremos 3' de diferente longitud. Las secuencias de codificación así como las de no codificación del clon 19E eran idénticas a las del clon 19F; estos clones diferían en la longitud de la región 3' de no codificación, donde el clon 19F era aproximadamente 34 pb más largo que el de 19E. Por lo tanto, se utilizaron las secuencias de 19F para completar la secuencia de codificación 3' de la proteína TSLP humana. Esto permitió la identificación de los 15 aminoácidos C-terminales que no están presentes en el EST. La PCR se llevó a cabo de acuerdo a procedimientos convencionales.

#### Ejemplo 2

##### 10 Purificación del Polipéptido de TSLP

##### *ELISA específico para TSLP*

Se colocan diluciones seriales de muestras que contienen TSLP (en NaHCO<sub>3</sub> 50 mM, llevadas hasta pH 9 con NaOH) sobre placas de microtitulación E.I.A. de fondo plano de 96 pozos Linbro/Titertek (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH) en una proporción de 100:1/pozo. Después de incubación a 4°C durante 16 horas, se lavan los pozos seis veces con PBS 200:1 que contiene Tween-20 al 0,05% (PBS-Tween). Se incuban luego los pozos con receptor de TSLP-FLAG® a razón de 1 µg/ml en PBS-Tween con suero fetal de ternero (FCS) durante 90 minutos (100:1 por pozo), seguido por lavado como anteriormente. Luego, se incuban cada pozo con el anti-FLAG® (anticuerpo monoclonal M2 a razón de 1 µg/ml en PBS-Tween que contiene FCS al 5% durante 90 minutos (100:1 por pozo), seguido por lavado como anteriormente. Posteriormente, se incubaron los pozos con un anticuerpo policlonal conjugado con peroxidasa de rábano picante específico para anti-mIgG1 de cabra (una dilución 1:5000 del patrón comercial en PBS-Tween que contiene FCS al 5%) durante 90 minutos (100:1 por pozo). El anticuerpo conjugado con HRP se obtiene de Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Alabama. Se lavan luego los pozos seis veces, como anteriormente.

Para el desarrollo del ELISA, se añade a los pozos una mezcla de sustrato [100:1 por pozo de una premezcla 1:1 del Sustrato de Peroxidasa TMB y Solución B de Peroxidasa (Kirkegaard Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland)]. Después de una suficiente reacción de color, se termina la reacción enzimática por medio de la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N (50:1 por pozo). Se determina la intensidad del color (que indica el enlazamiento del receptor de TSLP a TSLP) midiendo la extinción a 450 nm sobre un lector de placas V Max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

#### Ejemplo 3

##### *Secuencia de Aminoácidos*

La secuencia de aminoácidos de TSLP humana se determinó por medio de traducción de la secuencia de nucleótidos de TSLP humana. El marco de lectura escogido se basó en la homología de TSLP humana con TSLP murina.

#### Ejemplo 4

##### *Secuencias de Aminoácidos y de ADN*

La secuencia de ácido nucleico de TSLP humana se determinó por medio de secuenciación bicatenaria estándar de la secuencia compuesta del clon 1407260 de EST IMAGE, acceso #AA889581, y la secuencia adicional 3' del clon 19F. La secuencia de nucleótidos del ADN aislado de TSLP humana y la secuencia de aminoácidos codificada así, se presentan en las SEQ ID NOs: 1 y 2. La secuencia del fragmento completo de ADN de TSLP humana aislada por medio de PCR corresponde a los nucleótidos 1 a 767 de la SEQ ID NO: 1, que codifica a los aminoácidos 1 a 159 de la SEQ ID NO: 2.

La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 muestra una significativa similitud (49%) e identidad (43%) con la TSLP murina y homología débil con IL-7.

#### Ejemplo 5

##### *Anticuerpos Monoclonales que se Enlazan a TSLP*

Este ejemplo ilustra un método para preparar anticuerpos monoclonales que se enlazan a TSLP. Los inmunógenos adecuados que se pueden emplear en la generación de tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, un polipéptido de TSLP humana purificada o a un fragmento inmunogénico del mismo tal como el dominio extracelular, o las proteínas de fusión que contienen a la TSLP humana (por ejemplo, una proteína soluble de fusión TSLP/Fc).

Se puede utilizar la TSLP humana purificada para generar anticuerpos monoclonales inmunoreactivos con ella, utilizando técnicas convencionales tales como aquellas descritas en la patente estadounidense No. 4.411.993. En resumen se inmunizan los ratones con inmunógeno de TSLP humana y emulsionado en adyuvante completo de Freund, y se lo inyecta en el rango de cantidades entre 10 y 100 µg en forma subcutánea o intraperitoneal. Diez a doce días después, se les inyecta un refuerzo a los animales inmunizados con TSLP humana adicional emulsionada con adyuvante de Freund incompleto. Se les suministra una dosis de refuerzo periódicamente a los ratones tiempo después en un cronograma de inmunización semanal o bisemanal. Se toman periódicamente muestras de suero por medio de sangrado retroorbital

o de un corte en la punta de la cola para analizar los anticuerpos de TSLP por medio del ensayo de transferencia de punto, ELISA (Ensayo de Inmunoabsorción Enzimática) o inhibición de enlazamiento al receptor de TSLP.

Después de la detección del título de un anticuerpo apropiado, a los animales positivos se les suministra una última inyección intravenosa de TSLP humana en solución salina. Tres a cuatro días después, se sacrifican los animales, se recolectan las células del bazo, y se las fusiona con una línea de células de mieloma murino, por ejemplo, NS 1 o preferiblemente P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580). Las fusiones generan células de hibridoma, que se siembran en múltiples placas de microtitulación en un medio selectivo de HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, de híbridos de mieloma, y de híbridos de células de bazo.

Las células de hibridoma se seleccionan por medio de ELISA por la reactividad contra TSLP purificada por medio de adaptaciones de las técnicas divulgadas en (Engvall y colaboradores, *Immunochem.* 8:871 (1971)) y en la patente estadounidense No. 4.703.004. Una técnica de selección preferida es la técnica de captura de anticuerpos descrita en (Beckmann y colaboradores, *J. Immunol.* 144:4212 (1990)). Las células de hibridoma positivo se pueden inyectar en forma intraperitoneal en ratones BALB/c singéneos para producir ascites que contienen altas concentraciones de anticuerpos monoclonales anti-TSLP. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vitro* en frascos o en botellas rodantes por medio de diferentes técnicas. Los anticuerpos monoclonales producidos en ascites de ratón se pueden purificar por precipitación con sulfato de amonio, seguido por cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, se puede utilizar también cromatografía de afinidad que se basa en el enlazamiento de anticuerpo a Proteína A o a Proteína G, así como la cromatografía de afinidad con base en el enlazamiento a TSLP.

#### Ejemplo 6

##### *Análisis de Transferencias Northern*

Se investigó la distribución en el tejido de ARNm de TSLP humana por medio de análisis de transferencias de Northern, de la siguiente manera. Se añadió una alícuota marcada en forma radioactiva a dos diferentes transferencias de Northern de tejido humano múltiple (Clontech, Palo Alto, CA; Biochain, Palo Alto, CA). Se hibridaron las transferencias en 10X Denhardt's, Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 900 mM, pirofosfato de Na al 0.1%, SDS al 1%, 200 µg/mL de ADN de esperma de salmón. La hibridación se llevó a cabo durante la noche a 63°C en formamida al 50% como se describió anteriormente (March y colaboradores, *Nature* 315:641-647 (1985)). Se lavaron luego las transferencias con 2X SSC, SDS al 0.1% a 68°C durante 30 minutos.

Una transcripción única de 1,4 kilobases (kb) estaba presente en corazón, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículo, ovario, intestino delgado, colon. Los tejidos negativos fueron cerebro, placenta, y leucocitos en sangre periférica. Las células y los tejidos con los niveles más altos de ARNm de TSLP son corazón, hígado, próstata y testículo, como se observa por medio de la comparación para controlar explorando con una sonda específica para β-actina.

#### Ejemplo 7

##### *Ensayo de Enlazamiento*

La TSLP humana de longitud completa se puede expresar y analizar por la habilidad para enlazar a los receptores de TSLP. El ensayo de enlazamiento se puede llevar a cabo como sigue.

Se emplea una proteína de fusión que contiene un péptido de cierre de leucina fusionado al N-terminal de un polipéptido soluble de TSLP humana (LZ-TSLP) en el ensayo. Se prepara una construcción de expresión, esencialmente como se describió para la preparación de la construcción de expresión FLAG® (TSLP) en (Wiley y colaboradores, *Immunity*, 3:673-682 (1995)), excepto que el ADN que codifica al péptido FLAG® fue reemplazado con una secuencia que codifica a un cierre modificado de leucina que permite la trimerización. La construcción, en el vector de expresión pDC409, codifica una secuencia líder derivada de citomegalovirus humano, seguido por la fracción de cierre de leucina fusionada al N-terminal de un polipéptido soluble de TSLP humana. El LZ-TSLP se expresa en células CHO, y se purifican a partir del sobrenadante del cultivo.

El vector de expresión designado como pDC409 es un vector de expresión de mamífero derivado del vector pDC406 descrito en (McMahan y colaboradores, *EMBO J.* 10:2821-2832 (1991)). Las características añadidas a pDC409 (comparadas con las de pDC406) incluyen sitios de restricción adicionales únicos en el sitio de clonación múltiple (mcs); tres codones de detención (uno en cada marco de lectura) posicionados secuencia abajo del mcs; y un promotor polimerasa T7, secuencia abajo del mcs, que facilita la secuenciación del ADN insertado en los mcs.

Para la expresión de la proteína de TSLP humana de longitud completa, la región entera de codificación (esto es, la secuencia de ADN presentada en la SEQ ID NO: 1) se amplifica por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El molde empleado en la PCR es el clon de ADNc aislado de una biblioteca de ADNc de testículo humano, como se describió en el Ejemplo 1. El ADN aislado y amplificado se inserta en el vector de expresión pDC409, para producir una construcción designada como pDC409-TSLP.

El polipéptido de LZ-TSLP se emplea para analizar la habilidad para enlazarse a las células huésped que expresan a los receptores recombinantes o endógenos de TSLP, como se describió anteriormente. Se cultivan las células que expresan al receptor de TSLP en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina, estreptomycin y glutamina. Las células se incuban con LZ-TSLP (5 mg/ml) aproximadamente durante 1 hora. Después de la incubación, se lavan las células para remover la LZ-TSLP no enlazada y se incuban con anticuerpo monoclonal anti-LZ biotinilado (5 mg/ml), y estreptavidina conjugada con ficoeritrina (1:400), antes del análisis por medio de escaneo de las células activadas por fluorescencia (FACS). El análisis citométrico se lleva a cabo sobre un FACScan (Beckton Dickinson, San Jose, CA).

Las células que expresan a los receptores de TSLP mostraron un enlazamiento significativamente mejorado de LZ-TSLP, comparado con las células de control que no expresan a los receptores de TSLP.

#### Ejemplo 8

#### Inducción del Desarrollo de Células T a partir de Médula Ósea por medio de TSLP e IL-7

La TSLP humana, en combinación con IL-7, induce la excreción de células T a partir de médula ósea humana.

Se aislaron células mononucleares derivadas de médula ósea humana (BM MNC) por medio de centrifugación de médula ósea entera sobre Ficoll. Se cultivaron las BM MNC en medio de McCoy suplementado con suero fetal bovino al 10% y, suplementos de aminoácido y vitamina, en una concentración en el rango entre  $4,5-10 \times 10^5$  células/ml en un volumen total de 6 ó 7 ml por frasco (T25). La TSLP humana (20 ng/ml) y otras citoquinas, por ejemplo, IL-7, SLF (esto es factor de acero o factor de células madre, o factor de crecimiento de mastocitos), o flt3L, ya sea solos o en combinación, fueron añadidas a los cultivos el día 0. Después de 14 días y después semanalmente, se removió la mitad del cultivo para recuento. Se añadieron medio fresco y citoquinas a los cultivos para restituir el volumen total a 6 ó 7 ml.

Las células cultivadas fueron analizadas también por medio de citometría de flujo catorce días después del cultivo y luego semanalmente, utilizando anticuerpos específicos para los antígenos en la superficie de la célula. Los anticuerpos utilizados fueron específicos para los antígenos de células T (esto es, las células T  $\alpha\beta$  CD56), antígenos de monocito (esto es, CD14), y antígenos de granulocito (esto es, CD15).

La adición de TSLP humana e IL-7 a cultivos de BM MNC indujo el crecimiento celular como se indica en la Tabla 1. El día 0, aproximadamente el 5% de BM MNC eran células T. Después de 2 semanas de cultivo con TSLP e IL-7, los cultivos consistían de 70% de células T CD3<sup>+</sup>. El día 21, 86% de las células eran células T CD3<sup>+</sup>. Los cultivos contenían predominantemente células T hasta la terminación del experimento el día 42.

TABLA 1

| Tratamiento | Rendimiento Total de Células ( $\times 10^5$ ) |        |        |        |        |           |
|-------------|------------------------------------------------|--------|--------|--------|--------|-----------|
|             | Día 0                                          | Día 14 | Día 21 | Día 28 | Día 42 | Acumulado |
|             | 13,5                                           |        |        |        |        |           |
| Medio       |                                                | 6      | 1,1    | 0,4    | 0,9    | 8,4       |
| TSLP        |                                                | 3,9    | 2,1    | 1      | 2,9    | 9,9       |
| IL-7        |                                                | 4,2    | 7,4    | 4,4    | 4,6    | 20,6      |
| IL-7+TSLP   |                                                | 10,3   | 12,1   | 17,2   | 7,5    | 47,1      |
| SLF         |                                                | 3,7    | 4,3    | 1,1    | 0,9    | 10        |
| SLF+TSLP    |                                                | 5,4    | 6,9    | 1      | 1,6    | 14,9      |
| flt3L       |                                                | 6,3    | 2,3    | 2,8    | 1,8    | 13,2      |
| flt3L+TSLP  |                                                | 7,7    | 4,7    | 2,7    | 3,1    | 18,2      |

En otro conjunto de experimentos, tres lotes separados de TSLP humana marcados con His/FLAG® (TSLP 7489, TSLP 7811, o TSLP 7812) fueron analizados solos o en combinación con IL-7 por la habilidad para afectar la supervivencia y expansión de las células. Los cultivos de BM MNC se obtuvieron a partir de dos muestras separadas de médula ósea fresca y sembrados en una concentración ya sea de  $5 \times 10^5$  células/ml (Grupo 1) o  $10 \times 10^5$  células/ml (Grupo 2). Se añadió TSLP marcado con His/FLAG® (20 mg/ml) e IL-7 a cultivos como se describió anteriormente. La TSLP combinada con IL-7 resultó en la expansión de los cultivos de BM MNC como se indica en la Tabla 2 (muestra 1 de médula ósea) y en la Tabla 3 (muestra 2 de médula ósea). Hacia el día 21, 80% de la población expandida de células consistía de células T CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$ <sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$ <sup>+</sup>. En cuatro de los cultivos tratados con IL-7 y TSLP, las células se expandieron en los cultivos que contenían predominantemente células T hasta la terminación de los experimentos en las semanas 4-5.

# ES 2 288 036 T3

TABLA 2

| Rendimiento Total de Células (x 10 <sup>5</sup> ) |       |        |        |        |        |           |
|---------------------------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|-----------|
| Tratamiento                                       | Día 0 | Día 14 | Día 21 | Día 28 | Día 35 | Acumulado |
| Grupo 1 (5 x 10 <sup>5</sup> )                    | 17,5  |        |        |        |        |           |
| Medio                                             |       | 4      | 1,3    | 1,4    | ND*    | 6,7       |
| IL-7                                              |       | 8,4    | 6,5    | 7,1    | ND*    | 22        |
| TSLP 7489                                         |       | 4,4    | 1,5    | 1,2    | ND*    | 7,1       |
| TSLP 7811                                         |       | 5,2    | 1,7    | 1,2    | ND*    | 8,1       |
| TSLP 7812                                         |       | 2,8    | 1,4    | 2,3    | ND*    | 6,5       |
| IL-7 + T7489                                      |       | 12,4   | 9,1    | 8,3    | ND*    | 29,8      |
| IL-7 + T7811                                      |       | 10,5   | 5,3    | 8,4    | ND*    | 24,2      |
| IL-7 + T7812                                      |       | 9,7    | 6,5    | 4,7    | ND*    | 20,9      |
| Tratamiento                                       | Día 0 | Día 14 | Día 21 | Día 28 | Día 35 | Acumulado |
| Grupo 2 (10 x 10 <sup>5</sup> )                   | 35    |        |        |        |        |           |
| Medio                                             |       | 6,6    | 3,1    | 2,2    | ND*    | 11,9      |
| IL-7                                              |       | 14,8   | 10,1   | 3,7    | ND*    | 32,3      |
| TSLP 7489                                         |       | 11,5   | 3,3    | 2,9    | ND*    | 17,7      |
| TSLP 7811                                         |       | 13,3   | 2,8    | 3,1    | ND*    | 19,2      |
| TSLP 7812                                         |       | 13     | 3,2    | 2,6    | ND*    | 18,8      |
| IL-7 + T7489                                      |       | 25,6   | 17,7   | 8      | 10,9   | 62,2      |
| IL-7 + T7811                                      |       | 18,8   | 16,8   | 10     | 15,7   | 61,3      |
| IL-7 + T7812                                      |       | 22,4   | 13,5   | 10,4   | 11,6   | 57,9      |
| *ND= no se determinó (cultivo agotado)            |       |        |        |        |        |           |

TABLA 3

| Rendimiento Total de Células (x 10 <sup>5</sup> ) |       |        |        |        |        |        |           |
|---------------------------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------|
| Tratamiento                                       | Día 0 | Día 14 | Día 21 | Día 23 | Día 28 | Día 35 | Acumulado |
| Grupo 1 (5 x 10 <sup>5</sup> )                    | 17,5  |        |        |        |        |        |           |
| Medio                                             |       | 3,1    | 0,9    | ND*    | 0,8    | ND*    | 4,8       |
| IL-7                                              |       | 3,8    | 8,9    | ND*    | 8      | ND*    | 20,7      |
| TSLP 7489                                         |       | 3      | 1,1    | ND*    | 0,8    | ND*    | 4,9       |
| TSLP 7811                                         |       | 2,6    | 1,3    | ND*    | ND*    | ND*    | 3,9       |
| TSLP 7812                                         |       | 3,8    | 1,2    | ND*    | 0,9    | ND*    | 5,9       |
| IL-7 + T7489                                      |       | 8,9    | 80     | 39,4   | 18,2   | 21     | 167,5     |
| IL-7 + T7811                                      |       | 6,2    | 12,5   | ND*    | 16,7   | 14,3   | 49,7      |
| IL-7 + T7812                                      |       | 7,1    | 14,5   | ND*    | 11,1   | 11,6   | 44,3      |
| *ND= no se determinó (cultivo agotado)            |       |        |        |        |        |        |           |

# ES 2 288 036 T3

TABLA 3 (continuación)

| Tratamiento                            | Día 0 | Día 14 | Día 21 | Día 23 | Día 28 | Día 35 | Acumulado |
|----------------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------|
| Grupo 2 (10 x 10 <sup>5</sup> )        | 35    |        |        |        |        |        |           |
| Medio                                  |       | 6,6    | 1,9    | ND*    | 1,8    | ND*    | 10,3      |
| IL-7                                   |       | 10,7   | 19     | ND*    | 16,5   | 29,2   | 75,4      |
| TSLP 7489                              |       | 6,8    | 3,2    | ND*    | 3,3    | ND*    | 13,3      |
| TSLP 7811                              |       | 8,7    | 3,3    | ND*    | 3,4    | ND*    | 15,4      |
| TSLP 7812                              |       | 7,1    | 3,1    | ND*    | 2,7    | ND*    | 12,9      |
| IL-7 + T7489                           |       | 18,1   | 31,4   | 20     | 16,7   | 20,4   | 106,6     |
| IL-7 + T7811                           |       | 13,9   | 26,2   | 46,8   | 17,9   | 19,2   | 124       |
| IL-7 + T7812                           |       | 15,1   | 24,4   | 88,4   | 20,6   | 26,6   | 175,1     |
| *ND= no se determinó (cultivo agotado) |       |        |        |        |        |        |           |

# REIVINDICACIONES

1. Una molécula aislada de ácido nucleico que codifica a un polipéptido que estimula la proliferación de linfocitos, seleccionada del grupo que consiste de:
  - (a) un polinucleótido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1;
  - (b) un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2;
  - (c) un polinucleótido aislado que consiste de la SEQ ID NO: 1; y
  - (d) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 90% idéntica a la SEQ ID NO: 1.
2. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde el polinucleótido codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
3. Un vector recombinante que dirige la expresión de la molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 1 ó 2.
4. Una célula huésped transfectada o traducida con el vector de la reivindicación 3.
5. Un polipéptido aislado codificado por la molécula de ácido nucleico de las reivindicaciones 1 ó 2.
6. El polipéptido aislado de acuerdo a la reivindicación 5 que tiene un peso molecular aproximadamente de 21.000 Daltons como se determinó por medio de SDS-PAGE.
7. Un polipéptido purificado de TSLP seleccionado del grupo que consiste de:
  - a) el polipéptido de TSLP de la SEQ ID NO: 2;
  - b) un fragmento del polipéptido de (a), desde el aminoácido 29 hasta el aminoácido 159, y desde el aminoácido 35 hasta el aminoácido 159 de la SEQ ID NO: 2;
  - c) un polipéptido de TSLP que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y
  - d) un polipéptido de TSLP que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID NO: 2.
8. El polipéptido de TSLP de la SEQ ID NO: 2.
9. El polipéptido aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 en una forma no glicosilada.
10. Un anticuerpo aislado que se enlaza a un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 5-9.
11. Un anticuerpo de acuerdo a la reivindicación 10, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
12. Una proteína de fusión que comprende al polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-9 fusionada al C-terminal o N-terminal de otra proteína o péptido o polipéptido.
13. Una composición que comprende un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 o un anticuerpo de acuerdo a las reivindicaciones 10 u 11, y un diluyente, excipiente, o portador fisiológicamente aceptable.
14. Un método para la producción de un polipéptido de TSLP que comprende el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 4 bajo condiciones que promuevan la expresión, y la recuperación del polipéptido del medio de cultivo.
15. El método de la reivindicación 14, en donde la célula huésped se selecciona del grupo que consiste de células bacterianas, células de levadura, células de plantas, y células de animales.
16. En un método *in vitro* de estimulación de la proliferación de linfocitos, que comprende la incubación de linfocitos con el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.
17. El método de la reivindicación 16, que comprende además la incubación de los linfocitos con IL-7.
18. El método de la reivindicación 16, que comprende además la incubación de los linfocitos con una citoquina seleccionada del grupo que consiste de Factor de Acero, Factor de Célula Madre, Factor de Crecimiento de Mastocitos y el Ligando de flt3.

## ES 2 288 036 T3

19. Un método *in vitro* de estimulación del desarrollo de linfocitos o linfopoyesis que comprende la incubación de células progenitoras con el polipéptido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.

20. El método de la reivindicación 19, que comprende además la incubación de las células progenitoras con IL-7.

21. El método de las reivindicaciones 19 ó 20, en donde las células progenitoras son células mononucleares derivadas de médula ósea.

22. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 para uso en un método de estimulación de la proliferación de linfocitos *in vivo*, en donde dicho método comprende la incubación de linfocitos con el polipéptido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.

23. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 para ser usado en un método de acuerdo a la reivindicación 22, en donde el método comprende además la incubación de linfocitos con IL-7.

24. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 para ser usado en un método de estimulación del desarrollo de linfocitos o linfopoyesis *in vivo*, en donde dicho método comprende la incubación de células progenitoras con el polipéptido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.

25. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 para ser usado en un método de acuerdo a la reivindicación 24, en donde el método comprende además la incubación de las células progenitoras con IL-7.

26. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 para ser usado en un método de acuerdo a las reivindicaciones 24 ó 25, en donde las células progenitoras son células mononucleares derivadas de médula ósea.

27. El polipéptido de cualquiera de las reivindicación 5 a 9 para ser usado en terapia.

28. El uso del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 para la elaboración de una composición farmacéutica para estimular la proliferación o el desarrollo de linfocitos o para estimular la linfopoyesis.

Nombre: TSLP

```

  1  GCAGCCAGAA AGCTCTGGAG CATCAGGGAG ACTCCAACCTT AAGGCAACAG
 51  CATGGGTGAA TAAGGGCTTC CTGTGGACTG GCAATGAGAG GCAAAACCTG
101  GTGCTTGAGC ACTGGCCCTT AAGGCAGGCC TTACAGATCT CTTACACTCG
151  TGGTGGGAAG AGTTTAGTGT GAAACTGGGG TGGAAATTGGG TGTCCACGTA
201  TGTTCCTTTT TGCCTTACTA TATGTTCTGT CAGTTTCTTT CAGGAAAATC
251  TTCATCTTAC AACTTGTAGG GCTGGTGTTA ACTTACGACT TCACTAACTG
301  TGACTTTGAG AAGATTAAAG CAGCCTATCT CAGTACTATT TCTAAAGACC
351  TGATTACATA TATGAGTGGG ACCAAAAGTA CCGAGTTCAA CAACACCGTC
401  TCTTGTAGCA ATCGGCCACA TTGCCTTACT GAAATCCAGA GCCTAACCTT
451  CAATCCCACC GCCGGCTGCG CGTCGCTCGC CAAAGAAATG TTCGCCATGA
501  AACTAAGGC  TGCCTTAGCT ATCTGGTGCC CAGGCTATTC GGAAACTCAG
551  ATAAATGCTA CTCAGGCAAT GAAGAAGAGG AGAAAAAGGA AAGTCACAAC
601  CAATAAATGT CTGGAACAAG TGTCACAATT ACAAGGATTG TGGCGTCGCT
651  TCAATCGACC TTTACTGAAA CAACAGTAAA CCATCTTTAT TATGGTCATA
701  TTTCACAGCC CAAAATAAAT CATCTTTATT AAGTAAAAAA AAA
      (SEQ ID NO:1)

```

FIGURA 1

Nombre: TSLP (polipéptidos)

```
1 MFPFALLYVL SVSFRKIFIL QLVGLVLTYP FTNCDFEKIK AAYLSTISKD
51 LITYMSGTKS TEFNNTVSCS NRPHCLTEIQ SLTFNPTAGC ASLAKEMFAM
101 KTKAALAIWC PGYSETQINA TQAMKKRRKR KVTTNKCLEQ VSQLOGLWRR
151 FNRPLKQQ (SEQ ID NO:2)
```

FIGURA 2

# ES 2 288 036 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Sims, John  
 Lyman, Stewart  
 5 Armstrong, Allison  
 McKenna, Hilary  
 <120> ADN de TSLP Humana y Polipéptidos  
 <130> 03260.0087-00304  
 10 <140>  
 <141>  
 <150> 60/108.452  
 <151> 1998-11-13  
 15 <160> 5  
 <170> Patent In Ver. 2.0  
 <210> 1  
 20 <211> 743  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25 <400> 1

```

      gcagccagaa agctctggag catcagggag actccaactt aaggcaacag catgggtgaa 60
30  taagggcttc ctgtggactg gcaatgagag gcaaaacctg gtgcttgagc actggcccct 120
      aaggcaggcc ttacagatct ctacactcg tggagggaag agtttagtgt gaaactgggg 180
35  tggaaattggg tgtccacgta tgttcccttt tgccttacia tatgttctgt cagtttcttt 240
      caggaaaatc ttcatcttac aacttgtagg gctgggtgta acttacgact tcactaactg 300
40  tgactttgag aagattaaag cagcctatct cagtactatt tctaaagacc tgattacata 360
      tatgagtggg accaaaagta ccgagttcaa caacaccgic tctttagca atcggccaca 420
      ttgccttact gaaatccaga gcctaacctt caatcccacc gccggctgcg cgtcgctcgc 480
45  caaagaaatg ttcgcatga aaactaaggc tgccttagct atctggtgcc caggctattc 540
      ggaactcag ataaatgcta ctcaggcaat gaagaagagg agaaaaagga aagtcacaac 600
50  caataaatgt ctggaacaag tgcacaaatt acaaggattg tggcgtcgct tcaatcgacc 660
      tttactgaaa caacagtaaa ccacttttat tatggtcata ttacacagcc caaataaat 720
55  catctttatt aagtaaaaaa aaa                                     743
  
```

<210> 2  
 60 <211> 159  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

65

# ES 2 288 036 T3

<400> 2

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

## ES 2 288 036 T3

<210> 3  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido antigénico utilizado en proteínas de fusión  
 10 <400> 3  
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 1 5  
 15  
 <210> 4  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido de cierre de leucina  
 25 <400> 4  
 Pro Asp Val Ala Ser Leu Arg Gln Gln Val Glu Ala Leu Gln Gly Gln  
 1 5 10 15  
 30 Val Gln His Leu Gln Ala Ala Phe Ser Gln Tyr  
 20 25  
 <210> 5  
 35 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido de cierre de leucina  
 <400> 5  
 45 Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile  
 1 5 10 15  
 Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu  
 20 25 30  
 50 Arg  
 55  
 60  
 65