

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 124**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 14/715** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08022206 .0**  
96 Fecha de presentación: **28.06.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2077279**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.07.2009**

54 Título: **Moléculas de receptor de linfopoyetina estromal tímica y usos de las mismas**

30 Prioridad:  
**28.06.2000 US 214866**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.11.2012**

73 Titular/es:  
**AMGEN INC. (100.0%)**  
**ONE AMGEN CENTER DRIVE**  
**THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:  
**SARIS, CHRISTIAAN M. y**  
**CHANG, MING-SHI**

74 Agente/Representante:  
**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 391 124 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Moléculas de receptor de linfopoyetina estromal tímica y usos de las mismas

5 **Campo de la Invención**

La presente invención se refiere al uso de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que inhibe la unión de la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) al polipéptido receptor de linfopoyetina estromal tímica (TSLPR) *in vitro*. La invención también se refiere al uso de dicho anticuerpo antagonista o fragmento del mismo en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad, trastorno o afección relacionada con la TSLP. La invención también se refiere a dicho anticuerpo antagonista o fragmento del mismo para el uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección relacionada con la TSLP.

15 **Antecedentes de la Invención**

Los avances técnicos en la identificación, clonación, expresión y manipulación de moléculas de ácido nucleico y el descifrado del genoma humano han acelerado enormemente el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos. Las técnicas de secuenciación rápida de ácidos nucleicos pueden generar en la actualidad información de secuencia a velocidades sin precedentes y, acopladas con análisis informáticos, permiten el ensamblaje de secuencias solapantes en genomas parciales y completos y la identificación de regiones codificantes de polipéptidos. Una comparación de una secuencia de aminoácidos predicha con una recopilación de base de datos de secuencias de aminoácidos conocidas permite determinar el grado de homología con secuencias previamente identificadas y/o puntos de referencia estructurales. La clonación y expresión de una región codificante de un polipéptido de una molécula de ácido nucleico proporciona un producto polipeptídico para análisis estructurales y funcionales. La manipulación de moléculas de ácido nucleico y polipéptidos codificados puede conferir propiedades ventajosas a un producto para su uso como agente terapéutico.

A pesar de los avances técnicos significativos en la investigación del genoma a lo largo de la década pasada, en gran medida todavía no se ha logrado el potencial para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos basados en el genoma humano. Muchos genes que codifican agentes terapéuticos polipeptídicos potencialmente beneficiosos o los que codifican polipéptidos que pueden actuar como "dianas" para moléculas terapéuticas todavía no se han identificado. Por consiguiente, se describen polipéptidos y moléculas de ácido nucleico que los codifican, que tienen un beneficio diagnóstico o terapéutico.

Las citoquinas regulan una diversidad de respuestas celulares que incluyen proliferación, diferenciación y supervivencia. Entre las diferentes clases de citoquinas están las citoquinas de tipo I, que forman cuatro estructuras de haces  $\alpha$ -helicoidales que presentan una topología de arriba-arriba a abajo-abajo (Bazan, 1990, *Immunol. Today*, 11: 350-54; Leonard y O'Shea, 1998, *Annu. Rev. Immunol.* 16: 293-322; Leonard, *Fundamental Immunology* 741-74 (Paul, ed, Lippincott Raven Publishers 4 ed., 1999)). Las citoquinas de tipo I incluyen muchas interleuquinas, tales como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13 y IL-15, así como otras moléculas hematológicamente activas tales como GM-CSF, eritropoyetina, trombopoyetina y moléculas tales como hormona de crecimiento y prolactina. La señalización por citoquinas de tipo I implica la interacción con homodímeros, heterodímeros u oligómeros de receptores de orden superior de la superfamilia de receptores de citoquinas de tipo I. La unión a ligando induce la dimerización o la oligomerización de orden superior, dando como resultado la señalización aguas abajo, implicando en parte a la ruta Jak-STAT (Bazan, anteriormente; Leonard y O'Shea, anteriormente; Leonard, anteriormente).

La linfopoyetina estromal tímica (TLSP) es una citoquina cuyas actividades biológicas solapan con las de IL-7. Por ejemplo, tanto la TSLP como la IL-7 inducen la fosforilación de tirosina del factor de transcripción Stat5 (Isaksen *et al.*, 1999, *J. Immunol.* 163: 5971-77). La actividad de TSLP se identificó originariamente en el medio acondicionado de una línea celular estromal tímica que servía de soporte al desarrollo de células B IgM<sup>+</sup> murinas a partir de células progenitoras hematopoyéticas de hígado fetal (Friend *et al.*, 1994 *Exp. Hematol.* 22: 321-28). Además, la TSLP puede promover la linfopoyesis de células B en cultivos de médula ósea a largo plazo y puede coestimular tanto timocitos como células T maduras (Friend *et al.*, anteriormente; Levin *et al.*, 1999, *J. Immunol.* 162: 677-83). La TSLP también puede servir como una señal extrínseca para reorganizar específicamente el locus gamma del receptor de células T (Candeias *et al.*, 1997, *Immunol. Lett.* 57: 9-14). Por lo tanto, el aislamiento y la caracterización del receptor de citoquina para TSLP permitiría la identificación de compuestos útiles en el tratamiento de enfermedades u afecciones relacionadas con TSLP, tales como las que afectan al desarrollo de células B, al desarrollo de células T, a la reorganización de genes del receptor de células T o a la regulación del factor de transcripción Stat5.

60 **Sumario de la Invención**

La presente invención se refiere a las realizaciones siguientes:

65

1. Uso de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une específicamente al polipéptido de la SEC ID N°: 6 para inhibir la unión de la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) al receptor de linfopoyetina estromal tímica (TSLPR) *in vitro*.
- 5 2. Uso de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une específicamente al polipéptido de la SEC ID N°: 6 y que es capaz de inhibir la unión de la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) al receptor de linfopoyetina estromal tímica (TSLPR) en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad, trastorno o afección relacionada con la TSLP.
- 10 3. Un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une específicamente al polipéptido de la SEC ID N°: 6 y que es capaz de inhibir la unión de la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) al receptor de linfopoyetina estromal tímica (TSLPR), para el uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección relacionada con la TSLP.
- 15 4. El uso de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo de los puntos 1 a 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
5. El uso de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo de los puntos 1 a 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.
- 20 6. El uso de un anticuerpo antagonista de uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en el que el fragmento de anticuerpo comprende una o más regiones variables de dicho anticuerpo.
- 25 7. Uso de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3 para inhibir la activación del factor de transcripción Stat5.

En este documento se describen nuevas moléculas de ácido nucleico de TSLPR y los polipéptidos codificados.

30 La invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) la secuencia de nucleótidos que se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 11;
- 35 (b) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8;
- (c) una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones moderadamente o altamente rigurosas con la complementaria de (b) o (c); y
- (d) una secuencia de nucleótidos complementaria a (b) o (c).

40 En este documento se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 70 por ciento con el polipéptido que se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5, o SEC ID N°: 8, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8;
- 45 (b) una secuencia de nucleótidos que codifica una variante alélica o una variante de corte y empalme de la secuencia de nucleótidos que se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 11 o (a);
- 50 (c) una región de la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 11, (a) o (b) que codifica un fragmento polipeptídico de al menos aproximadamente 25 restos aminoacídicos, en la que el fragmento polipeptídico tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8, o es antigénico;
- 55 (d) una región de la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 11 o cualquiera de (a)-(c) que comprende un fragmento de al menos aproximadamente 16 nucleótidos;
- (e) una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones moderadamente o altamente rigurosas con la complementaria de cualquiera de (a)-(d); y
- 60 (f) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de (a)-(d).

En este documento se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 65 (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5, o SEC ID N°: 8, con al menos una sustitución de aminoácido conservativa, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID

Nº: 8;

(b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido como se expone en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8, con al menos una inserción de aminoácido, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8;

5 (c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido como se expone en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8 con al menos una delección de aminoácido, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8;

10 (d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido como se expone en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5, o SEC ID Nº: 8 que tiene un truncamiento C- y/o N-terminal, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5, o SEC ID Nº: 8;

15 (e) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido como se expone en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8 con al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en sustituciones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, delecciones de aminoácidos, truncamiento C-terminal y truncamiento N-terminal, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8;

(f) una secuencia de nucleótidos de cualquiera de (a)-(e) que comprende un fragmento de al menos aproximadamente 16 nucleótidos;

20 (g) una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones moderadamente o altamente rigurosas con la complementaria de cualquiera de (a)-(f);

(h) una secuencia de nucleótidos complementaria o cualquiera de (a)-(e).

En este documento se describe un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5, o SEC ID Nº: 8.

25 En este documento se describe un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) la secuencia de aminoácidos que se expone en cualquiera de las SEC ID Nº: 3, SEC ID Nº: 6 o SEC ID Nº: 9, comprendiendo opcionalmente además una metionina amino-terminal;

30 (b) una secuencia de aminoácidos para un ortólogo de cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8.

(c) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 70 por ciento con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8;

35 (d) un fragmento de la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8 que comprende al menos aproximadamente 23 restos aminoacídicos, en el que el fragmento tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5, o SEC ID Nº: 8, o es antigénico; y

40 (e) una secuencia de aminoácidos para una variante alélica o una variante de corte y empalme de la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5, o SEC ID Nº: 8 o cualquiera de (a)-(c).

45 En este documento se describe un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) la secuencia de aminoácidos que se expone en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8 con al menos una sustitución de aminoácido conservativa, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8;

50 (b) la secuencia de aminoácidos que se expone en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8 con al menos una inserción de aminoácido en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8;

(c) la secuencia de aminoácidos que se expone en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8 con al menos una delección de aminoácido, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8;

55 (d) la secuencia de aminoácidos que se expone en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8 que tiene un truncamiento C- y/o N-terminal, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8; y

60 (e) la secuencia de aminoácidos que se expone en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8 con al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en sustituciones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, delecciones de aminoácidos, truncamiento C-terminal y truncamiento N-terminal, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID Nº: 2, SEC ID Nº: 5 o SEC ID Nº: 8.

65 También se describen polipéptidos de fusión que comprenden secuencias de aminoácidos de TSLPR.

Se describe adicionalmente en este documento un vector de expresión que comprende las moléculas de ácido nucleico aisladas que se exponen en este documento, células hospedadoras recombinantes que comprenden las moléculas de ácido nucleico recombinantes que se exponen en este documento y un método de producción de un polipéptido TSLPR que comprende el cultivo de las células hospedadoras y, opcionalmente, el aislamiento del polipéptido producido de este modo.

También se describe en este documento un animal transgénico no humano que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido TSLPR. Las moléculas de ácido nucleico de TSLPR se introducen en el animal de una forma que permite la expresión y niveles aumentados de un polipéptido TSLPR, que puede incluir niveles circulantes aumentados. Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico de TSLPR se introducen en el animal de una forma que impide la expresión de polipéptido TSLPR endógeno (es decir, genera un animal transgénico que posee un gen de polipéptido TSLPR interrumpido (*knock out*)). El animal transgénico no humano es preferiblemente un mamífero y, más preferiblemente, un roedor tal como una rata o un ratón.

También se describen derivados de los polipéptidos TSLPR de la presente invención.

Además, se describen agentes de unión selectiva tales como anticuerpos y péptidos capaces de unirse específicamente a los polipéptidos TSLPR de la invención. Dichos anticuerpos y péptidos pueden ser agonistas o antagonistas.

También se describen en este documento composiciones farmacéuticas que comprenden los nucleótidos, polipéptidos o agentes de unión selectiva, y uno o más agentes de formulación farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas se usan para proporcionar cantidades terapéuticamente eficaces de los nucleótidos o polipéptidos que se describen en este documento. Además, se describen en este documento métodos de uso de los polipéptidos, moléculas de ácido nucleico y agentes de unión selectiva.

Los polipéptidos TSLPR y las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden usarse para tratar, prevenir, mejorar y/o detectar enfermedades y trastornos incluyendo los que se enumeran en este documento.

Se describe en este documento un método de ensayo de moléculas de ensayo para identificar una molécula de ensayo que se una a un polipéptido TSLPR. El método comprende poner en contacto un polipéptido TSLPR con una molécula de ensayo para determinar el grado de unión de la molécula de ensayo al polipéptido. El método comprende además determinar si dichas moléculas de ensayo son agonistas o antagonistas de un polipéptido TSLPR. Se describe adicionalmente en este documento un método de ensayo del impacto de las moléculas sobre la expresión de un polipéptido TSLPR o sobre la actividad de un polipéptido TSLPR.

También se describen en este documento métodos de regulación de la expresión y de modulación (es decir, aumento o disminución) de los niveles de un polipéptido TSLPR. Un método comprende administrar a un animal una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido TSLPR. En otro método, puede administrarse una molécula de ácido nucleico que comprende elementos que regulan o modulan la expresión de un polipéptido TSLPR. Los ejemplos de estos métodos incluyen terapia génica, terapia celular y terapia antisentido, como se describen adicionalmente en este documento.

#### Breve Descripción de las Figuras

Las Figuras 1A-1B ilustran la secuencia de nucleótidos del gen de TSLPR murino (SEC ID N°: 1) y la secuencia de aminoácidos deducida del polipéptido TSLPR murino (SEC ID N°: 2). Se indican el péptido señal (subrayado) y el dominio transmembrana (subrayado doble) predichos;

la Figura 2 ilustra un alineamiento de secuencias de aminoácidos del polipéptido TSLPR murino (secuencia superior; SEC ID N°: 2) y la cadena  $\gamma$  del receptor de citoquinas común murino ( $\gamma_c$ ) (secuencia inferior; SEC ID N°: 12). Se indican los restos idénticos (recuadrados), los sitios de glicosilación ligados a N potenciales (\*) y el péptido señal y el dominio transmembrana predichos (subrayados);

las Figuras 3A-3B ilustran la secuencia de nucleótidos del gen de TSLPR humano (SEC ID N°: 4) y la secuencia de aminoácidos deducida del polipéptido TSLPR humano (SEC ID N°: 5). Se indican el péptido señal (subrayado) y el dominio transmembrana (doble subrayado) predichos;

las Figuras 4A-4B ilustran la secuencia de nucleótidos de TSLPR humano/FLAG (SEC ID N°: 7) y la secuencia de aminoácidos deducida del polipéptido TSLPR humano/FLAG (SEC ID N°: 8). Se indican el péptido FLAG (subrayado de puntos), el péptido señal predicho y el dominio transmembrana (doble subrayado) predicho;

la Figura 5 ilustra un alineamiento de secuencias de aminoácidos del polipéptido TSLPR murino (secuencia superior, SEC ID N°: 2) y el polipéptido TSLPR humano (secuencia inferior, SEC ID N°: 5);

las Figuras 6A-6C ilustran (A) la traducción *in vitro* del polipéptido TSLPR murino, (B) la inmunoprecipitación de

polipéptido TSLPR murino a partir de células NAG 8/7 y (C) el análisis de transferencia de Northern de la expresión de ARNm de TSLPR murino.

5 La Figura 7 ilustra los resultados obtenidos en ensayos de proliferación usando células transfectadas con construcciones de expresión quiméricas para c-Kit/ $\gamma_c$ , c-Kit/TSLPR y c-Kit/ $\beta$  o c-Kit/ $\gamma_c$  y c-Kit/ $\beta$ .

10 Las Figuras 8A-8C ilustran los resultados obtenidos en ensayos de marcaje por afinidad en los que se añadió  $^{125}\text{I}$ -TSLP a células 293 transfectadas con construcciones de expresión para IL-7R $\alpha$  murino, TSLPR murino, IL-7R $\alpha$  murino y TSLPR murino o IL-7R $\alpha$  humano y TSLPR murino y después entrecruzados con DSS.

Las Figuras 9A-9D ilustran los resultados obtenidos en ensayos de desplazamiento de la unión.

15 La Figura 10 ilustra los resultados obtenidos en ensayos de CAT en los que se cotransfectaron células HepG2 con construcciones de expresión para IL-7R $\alpha$  y TSLPR o  $\gamma_c$  y pHRRE-CAT.

### Descripción Detallada de la Invención

20 Los títulos de sección usados en este documento son con fines de organización solamente y no deben interpretarse como limitantes de la presente cuestión descrita. Todas las referencias citadas en esta solicitud se incorporan expresamente por referencia en este documento.

### Definiciones

25 Las expresiones "gen de TSLPR" o "molécula de ácido nucleico de TSLPR" o "polinucleótido de TSLPR" se refieren a una molécula de ácido nucleico que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 11, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 y moléculas de ácido nucleico como se definen en este documento.

30 La expresión "variante alélica del polipéptido TSLPR" se refiere a una de varias formas alternativas posibles de origen natural de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma de un organismo o de una población de organismos.

35 La expresión "variante de corte y empalme de un polipéptido TSLPR" se refiere a una molécula de ácido nucleico, habitualmente ARN, que se genera por procesamiento alternativo de secuencias de intrones en un transcrito de ARN de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido TSLPR como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8.

40 La expresión "molécula de ácido nucleico aislada" se refiere a una molécula de ácido nucleico de la invención que (1) se ha separado de al menos aproximadamente el 50 por ciento de las proteínas, lípidos, hidratos de carbono u otros materiales con los que se encuentra naturalmente cuando el ácido nucleico total se aísla a partir de las células fuente, (2) no está unida a toda o a una porción de un polinucleótido con el que está unida la "molécula de ácido nucleico aislada" en la naturaleza, (3) está unida operativamente a un polinucleótido con el que no está unida en la naturaleza o (4) no aparece en la naturaleza como parte de una secuencia polinucleotídica más larga. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico aislada de la presente invención está sustancialmente libre de cualquier otra molécula o moléculas de ácido nucleico contaminantes u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que interferirían con su uso en la producción de polipéptidos o su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico o de investigación.

50 La expresión "secuencia de ácido nucleico" o "molécula de ácido de nucleico" se refiere a una secuencia de ADN o ARN. Las expresiones incluyen moléculas formadas a partir de cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN tales como, pero sin limitación, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinil-citosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil)-uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboxi-metilaminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-iso-penteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetil-guanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiamino-metil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarbonil-metiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutuosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido N-uracilo-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina.

El término "vector" se usa para referirse a cualquier molécula (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido o virus) que se usa para transferir información codificante a una célula hospedadora.

65 La expresión "vector de expresión" se refiere a un vector que es adecuado para la transformación de una célula hospedadora y contiene secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan la expresión de secuencias de ácido

nucleico heterólogas insertadas. La expresión incluye, pero sin limitación, procesos tales como la transcripción, la traducción y el corte y empalme de ARN si existen intrones.

5 La expresión “unida operativamente” se usa en este documento para referirse a una organización de secuencias flanqueantes en la que las secuencias flanqueantes así descritas se configuran o ensamblan para realizar su función habitual. Por lo tanto, una secuencia flanqueante unida operativamente a una secuencia codificante puede ser capaz de efectuar la replicación, transcripción y/o traducción de la secuencia codificante. Por ejemplo, una secuencia codificante está unida operativamente a un promotor cuando el promotor es capaz de dirigir la transcripción de esa secuencia codificante. Una secuencia flanqueante no tiene que ser contigua a la secuencia codificante, siempre que  
10 funcione correctamente. Por lo tanto, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias intermedias transcritas aunque no traducidas entre una secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora puede considerarse todavía “unida operativamente” a la secuencia codificante.

15 La expresión “célula hospedadora” se usa para referirse a una célula que se ha transformado o que es capaz de transformarse con una secuencia de ácido nucleico y, después, de expresar un gen de interés seleccionado. La expresión incluye la progenie de la célula parental, independientemente de que la progenie sea o no idéntica en morfología o en composición genética a la parental original, siempre que esté presente el gen seleccionado.

20 La expresión “polipéptido TSLPR” se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 y polipéptidos relacionados. Los polipéptidos relacionados incluyen fragmentos de polipéptido TSLPR, ortólogos de polipéptido TSLPR, variantes de polipéptido TSLPR y derivados de polipéptido TSLPR que poseen al menos una actividad del polipéptido que se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8. Los polipéptidos TSLPR pueden ser polipéptidos maduros, como se definen en este documento, y pueden o no tener un resto de metionina amino-terminal  
25 dependiendo del método por el que se preparen.

La expresión “fragmento del polipéptido TSLPR” se refiere a un polipéptido que comprende un truncamiento en el extremo amino-terminal (con o sin una secuencia líder) y/o un truncamiento en el extremo carboxilo-terminal del polipéptido que se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8. La expresión “fragmento de polipéptido TSLPR” también se refiere a truncamientos amino-terminales y/o carboxilo-terminales de ortólogos de polipéptido TSLPR, derivados de polipéptido TSLPR o variantes de polipéptido TSLPR o a truncamientos amino-terminales y/o carboxilo-terminales de los polipéptidos codificados por variantes alélicas del polipéptido TSLPR o por las variantes de corte y empalme del polipéptido TSLPR. Los fragmentos de polipéptido TSLPR pueden ser el resultado de un corte y empalme de ARN alternativo o de la actividad de proteasas *in vivo*. También se contemplan por la presente invención formas unidas a membrana de un polipéptido TSLPR. En realizaciones preferidas, los truncamientos y/o deleciones comprenden aproximadamente 10 aminoácidos, o aproximadamente 20 aminoácidos, o aproximadamente 50 aminoácidos, o aproximadamente 75 aminoácidos, o aproximadamente 100 aminoácidos o más de aproximadamente 100 aminoácidos. Los fragmentos de polipéptido producidos de este modo comprenderán aproximadamente 25 aminoácidos contiguos, o aproximadamente 50 aminoácidos, o aproximadamente 75 aminoácidos, o aproximadamente 100 aminoácidos, o aproximadamente 150 aminoácidos o aproximadamente 200 aminoácidos. Dichos fragmentos de polipéptidos TSLPR pueden comprender, opcionalmente, un resto de metionina amino-terminal. Se entenderá que dichos fragmentos pueden usarse, por ejemplo, para generar anticuerpos contra polipéptidos TSLPR.

45 La expresión “ortólogo del polipéptido TSLPR” se refiere a un polipéptido de otra especie que se corresponde con la secuencia de aminoácidos del polipéptido TSLPR que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8. Por ejemplo, los polipéptidos TSLPR de ratón y humano se consideran ortólogos entre sí.

50 La expresión “variantes del polipéptido TSLPR” se refiere a polipéptidos TSLPR que comprenden secuencias de aminoácidos que tienen una o más sustituciones, deleciones (tales como deleciones internas y/o fragmentos del polipéptido TSLPR) y/o adiciones (tales como adiciones internas y/o polipéptidos de fusión TSLPR) en la secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos del polipéptido TSLPR que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 (con o sin una secuencia líder). Las variantes pueden ser de origen natural (por ejemplo, variantes alélicas del polipéptido TSLPR, ortólogos del polipéptido TSLPR y variantes de corte y empalme del polipéptido TSLPR) o construirse artificialmente. Dichas variantes del polipéptido TSLPR pueden prepararse a partir de las moléculas de ácido nucleico correspondientes que tienen una secuencia de ADN que varía conforme a la secuencia de ADN que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 11. En realizaciones preferidas, las variantes tienen de 1 a 3, o de 1 a 5 o de 1 a 10, o de 1 a 15, o de 1 a 20, o de 1 a 25, o de 1 a 50, o de 1 a 75, o de 1 a 100, o más de 100 sustituciones, inserciones, adiciones, y/o deleciones de aminoácidos, en las que las sustituciones pueden ser conservativas o no conservativas o cualquier combinación de las mismas.  
60

La expresión “derivados del polipéptido TSLPR” se refiere al polipéptido que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8, a fragmentos del polipéptido TSLPR, a ortólogos del polipéptido TSLPR o a variantes del polipéptido TSLPR, como se han definido en este documento, que se han modificado químicamente. La expresión “derivados del polipéptido TSLPR” también se refiere a los polipéptidos codificados por variantes  
65

alélicas del polipéptido TSLPR o variantes de corte y empalme del polipéptido TSLPR, como se han definido en este documento, que se han modificado químicamente.

5 La expresión “polipéptido TSLPR maduro” se refiere a un polipéptido TSLPR que carece de una secuencia líder. Un polipéptido TSLPR maduro también puede incluir otras modificaciones tales como el procesamiento proteolítico del extremo amino-terminal (con o sin una secuencia líder) y/o del extremo carboxilo-terminal, la escisión de un polipéptido más pequeño a partir de un precursor más grande, la glicosilación ligada a N y/o ligada a O y similares. Se representan polipéptidos TSLPR maduros ejemplares mediante las secuencias de aminoácidos que se exponen en las SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 6 y SEC ID N°: 9.

10 La expresión “polipéptido de fusión TSLPR” se refiere a una fusión de uno o más aminoácidos (tal como un péptido o proteína heteróloga) en el extremo amino-terminal o carboxilo-terminal del polipéptido que se muestra en la SEC ID N°: 2, fragmentos del polipéptido TSLPR, ortólogos del polipéptido TSLPR, variantes del polipéptido TSLPR o derivados de TSLPR, como se han definido en este documento. La expresión “polipéptido de fusión de TSLPR” también se refiere a una fusión de uno o más aminoácidos en el extremo amino-terminal o carboxilo-terminal del polipéptido codificado por las variantes alélicas del polipéptido TSLPR o las variantes de corte y empalme del polipéptido TSLPR, como se han definido en este documento.

15 La expresión “polipéptidos TSLPR biológicamente activos” se refiere a polipéptidos TSLPR que tienen al menos una actividad característica del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8. Además, un polipéptido TSLPR puede ser activo como inmunógeno; es decir, el polipéptido TSLPR contiene al menos un epítipo contra el que pueden generarse anticuerpos.

20 La expresión “polipéptido aislado” se refiere a un polipéptido de la presente invención que (1) se ha separado de al menos aproximadamente el 50 por ciento de los polinucleótidos, lípidos, hidratos de carbono u otros materiales con los que se encuentra naturalmente cuando se aísla a partir de la célula fuente, (2) no está unido (por interacción covalente o no covalente) a todo ni a una porción de un polipéptido con el que el “polipéptido aislado” está unido en la naturaleza (3) está unido operativamente (por interacción covalente o no covalente) con un polipéptido con el que no está unido en la naturaleza o (4) no existe en la naturaleza. Preferiblemente, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de cualquier otro polipéptido contaminante u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que interferirían con su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico o en investigación.

25 El término “identidad”, como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas polipeptídicas o dos o más moléculas de ácido nucleico, determinada por comparación de las secuencias. En la técnica, la “identidad” también se refiere al grado de parentesco entre secuencias de moléculas de ácido nucleico o polipéptidos, según el caso, determinada por el emparejamiento entre hebras de dos o más nucleótidos o dos o más secuencias de aminoácidos. La “identidad” mide el porcentaje de emparejamientos idénticos entre la más pequeña de dos o más secuencias con alineamiento con huecos (si existen) dirigido por un modelo matemático o programa informático en particular (es decir, “algoritmos”).

30 El término “similitud” es un concepto relacionado pero, al contrario que la “identidad”, la “similitud” se refiere a una medida del parentesco que incluye tanto emparejamientos idénticos como emparejamientos de sustituciones conservativas. Si dos secuencias polipeptídicas tienen, por ejemplo, 10/20 aminoácidos idénticos y los restantes son todos sustituciones no conservativas, entonces el porcentaje de identidad y de similitud serán ambos del 50%. Si en el mismo ejemplo existen cinco posiciones más en las que hay sustituciones conservativas, entonces el porcentaje de identidad continúa siendo del 50%, pero el porcentaje de similitud sería del 75% (15/20). Por lo tanto, en casos en los que existen sustituciones conservativas, el porcentaje de similitud entre dos polipéptidos será superior al porcentaje de identidad entre esos dos polipéptidos.

35 Las expresiones “de origen natural” o “nativo”, cuando se usan en relación a materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células hospedadoras y similares, se refieren a materiales que se encuentran en la naturaleza y no están manipulados por el hombre. De manera similar, las expresiones “de origen no natural” o “no nativo”, como se usan en este documento, se refieren a un material que no se encuentra en la naturaleza o que se ha modificado estructuralmente o sintetizado por el hombre.

40 Las expresiones “cantidad eficaz” y “cantidad terapéuticamente eficaz” se refieren cada una a la cantidad de un polipéptido TSLPR o de una molécula de ácido nucleico de TSLPR que se usa para mantener un nivel observable de una o más actividades biológicas de los polipéptidos TSLPR, como se expone en este documento.

45 Las expresiones “vehículo farmacéuticamente aceptable” o “vehículo fisiológicamente aceptable”, como se usan en este documento, se refieren a uno o más materiales de formulación adecuados para llevar a cabo o mejorar la administración del polipéptido TSLPR, de la molécula de ácido nucleico de TSLPR o del agente de unión selectiva a TSLPR como una composición farmacéutica.

50 El término “antígeno” se refiere a una molécula o a una porción de una molécula capaz de unirse por un agente de unión selectiva, tal como un anticuerpo y, adicionalmente, capaz de usarse en un animal para producir anticuerpos

capaces de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítipos.

La expresión “agente de unión selectiva” se refiere a una molécula o moléculas que tienen especificidad por un polipéptido TSLPR. Como se usan en este documento, los términos “específico” y “especificidad” se refieren a la capacidad de los agentes de unión selectiva de unirse a polipéptidos TSLPR humanos y no unirse a polipéptidos humanos que no sean TSLPR. Se entenderá, sin embargo, que los agentes de unión selectiva también pueden unirse a ortólogos del polipéptido que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8, es decir, a versiones interespecie del mismo, tales como polipéptidos TSLPR de ratón y rata.

El término “transducción” se usa para referirse a la transferencia de genes de una bacteria a otra, habitualmente por un fago. La “transducción” también se refiere a la adquisición y transferencia de secuencias celulares eucariotas por retrovirus.

El término “transfección” se usa para referirse a la captación de ADN extraño o exógeno por una célula y se dice que una célula se ha “transformado” cuando se ha introducido el ADN exógeno dentro de la membrana celular. Se conocen bien en la técnica, y se describen en este documento, varias técnicas de transfección. Véanse, por ejemplo, Graham *et al.*, 1973, *Virology* 52: 456; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davis *et al.*, *Basic Methods in Molecular Biology* (Elsevier, 1986); y Chu *et al.*, 1981, *Gene* 13: 197. Dichas técnicas pueden usarse para introducir uno o más restos de ADN exógeno en células hospedadoras adecuadas.

El término “transformación”, como se usa en este documento, se refiere a un cambio en las características genéticas de una célula y se dice que una célula se ha transformado cuando se ha modificado para que contenga un nuevo ADN. Por ejemplo, una célula está transformada cuando está genéticamente modificada respecto a su estado nativo. Después de la transfección o transducción, el ADN transformante puede recombinarse con el de la célula integrándose físicamente en un cromosoma de la célula, puede mantenerse de forma transitoria como un elemento episomal sin que se replique o puede replicarse independientemente como un plásmido. Se considera que una célula se ha transformado de forma estable cuando el ADN se replica con la división de la célula.

#### Parentesco de las moléculas de ácido nucleico y/o polipéptidos

Se entiende que las moléculas de ácido nucleico relacionadas incluyen variantes alélicas o de corte y empalme de la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 11, e incluyen secuencias que son complementarias a cualquiera de las secuencias de nucleótidos anteriores. Las moléculas de ácido nucleico relacionadas también incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende o consiste esencialmente en una sustitución, modificación, adición y/o deleción de uno o más restos aminoácidos, en comparación con el polipéptido de cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8. Dichos polipéptidos TSLPR relacionados pueden comprender, por ejemplo, una adición y/o una deleción de uno o más sitios de glicosilación ligados a N o ligados a O o una adición y/o una deleción de uno o más restos de cisteína.

Las moléculas de ácido nucleico relacionadas también incluyen fragmentos de moléculas de ácido nucleico de TSLPR que codifican un polipéptido de al menos aproximadamente 25 aminoácidos contiguos, o aproximadamente 50 aminoácidos, o aproximadamente 75 aminoácidos, o aproximadamente 100 aminoácidos, o aproximadamente 150 aminoácidos, o aproximadamente 200 aminoácidos o más de 200 restos aminoácidos del polipéptido TSLPR de cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8.

Además, las moléculas de ácido nucleico de TSLPR relacionadas también incluyen las moléculas que comprenden secuencias de nucleótidos que hibridan en condiciones moderada o altamente rigurosas, como se definen en este documento, con la secuencia complementaria completa de la molécula de ácido nucleico de TSLPR de cualquiera de las SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 11, o de una molécula que codifica un polipéptido, comprendiendo el polipéptido la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8, o de un fragmento de ácido nucleico, como se ha definido en este documento, o de un fragmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido como se define en este documento. Pueden prepararse sondas de hibridación usando las secuencias de TSLPR que se proporciona en este documento para explorar genotecas de ADNc, ADN genómico o sintético para determinar secuencias relacionadas. Las regiones del ADN y/o de la secuencia de aminoácidos del polipéptido TSLPR que presentan una identidad significativa con secuencias conocidas se determinan fácilmente usando algoritmos de alineamiento de secuencias, como se describen en este documento, y esas regiones pueden usarse para diseñar sondas para la exploración.

La expresión “condiciones altamente rigurosas” se refiere a las condiciones que están diseñadas para permitir la hibridación de cadenas de ADN cuyas secuencias son muy complementarias y para evitar la hibridación de ADN significativamente erróneamente emparejados. La rigurosidad de hibridación se determina principalmente por la temperatura, la fuerza iónica y la concentración de agentes desnaturalizantes tales como formamida. Son ejemplos de “condiciones altamente rigurosas” para hibridación y lavado cloruro sódico 0,015 M, citrato sódico 0,0015 M a 65-68°C o cloruro sódico 0,015 M, citrato sódico 0,0015 M y formamida al 50% a 42°C. Véanse Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Anderson *et al.*,

*Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* Cap. 4 (IRL Press Limited).

También pueden usarse condiciones más rigurosas (tales como una temperatura superior, una fuerza iónica menor y mayor concentración de formamida u otro agente desnaturizante); sin embargo, afectarán al índice de hibridación. Pueden incluirse otros agentes en los tampones de hibridación y de lavado con el fin de reducir la hibridación inespecífica y/o de fondo. Son ejemplos albúmina de suero bovino al 0,1%, polivinil-pirrolidona al 0,1%, pirofosfato sódico al 0,1%, dodecilsulfato sódico (NaDodSO<sub>4</sub> o SDS) al 0,1%, ficoll, solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (u otro ADN no complementario) y sulfato de dextrano, aunque también pueden usarse otros agentes adecuados. La concentración y tipos de estos aditivos pueden variarse sin afectar sustancialmente a la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Los experimentos de hibridación se realizan habitualmente a un pH de 6,8-7,4; sin embargo, en condiciones de fuerza iónica típicas, el índice de hibridación es prácticamente independiente del pH. Véase Anderson *et al.*, *Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach* Cap. 4 (IRL Press Limited).

Los factores que afectan a la estabilidad del dúplex de ADN incluyen la composición de bases, la longitud y el grado de emparejamiento erróneo de bases. Las condiciones de hibridación pueden ajustarse por un especialista en la técnica para adaptar estas variables y permitir que ADN de diferentes parentescos entre secuencias formen híbridos. La temperatura de fusión de un dúplex de ADN perfectamente emparejado puede estimarse mediante la siguiente ecuación:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 81,5 + 16,6 (\log[\text{Na}^+]) + 0,41 (\% \text{ G} + \text{C}) - 600/\text{N} - 0,72 (\% \text{ formamida})$$

en la que N es la longitud del dúplex formado, [Na<sup>+</sup>] es la concentración molar del ión sodio en la solución de hibridación o de lavado y % G + C es el porcentaje de bases de (guanina + citosina) en el híbrido. Para híbridos no perfectamente emparejados, la temperatura de fusión se reduce en aproximadamente 1°C por cada 1% de emparejamiento erróneo.

La expresión "condiciones moderadamente rigurosas" se refiere a condiciones en las que puede formarse un dúplex de ADN con un grado mayor de emparejamiento erróneo de pares de bases que el que podría producirse en "condiciones altamente rigurosas". Son ejemplos de "condiciones moderadamente rigurosas" típicas cloruro sódico 0,015 M, citrato sódico 0,0015 M a 50-65°C o cloruro sódico 0,015 M, citrato sódico 0,0015 M y formamida al 20% a 37-50°C. A modo de ejemplo, "condiciones moderadamente rigurosas" de 50°C en ión sodio 0,015 M permitirán aproximadamente un emparejamiento erróneo del 21%.

Se entenderá por los especialistas en la técnica que no existe una distinción absoluta entre "condiciones altamente rigurosas" y "condiciones moderadamente rigurosas". Por ejemplo, a ión sodio 0,015 M (sin formamida), la temperatura de fusión de un ADN largo perfectamente emparejado es de aproximadamente 71°C. Con un lavado 65°C (a la misma fuerza iónica), esto permitiría aproximadamente un 6% de emparejamiento erróneo. Para capturar secuencias relacionadas más distantes, un especialista en la técnica puede simplemente disminuir la temperatura o aumentar la fuerza iónica.

Una buena estimación de la temperatura de fusión en NaCl\* 1 M para sondas oligonucleotídicas de hasta aproximadamente 20 nt se proporciona mediante:

$$T_m = 2^{\circ}\text{C por par de bases A-T} + 4^{\circ}\text{C por par de bases G-C}$$

\*La concentración de ión sodio en sal de citrato sódico 6X (SSC) es 1 M. Véase Suggs *et al.*, *Developmental Biology Using Purified Genes* 683 (Brown y Fox, eds., 1981).

Las condiciones de lavado de alta rigurosidad para oligonucleótidos son habitualmente a una temperatura de 0-5°C por debajo de la T<sub>m</sub> del oligonucleótido en SSC 6X y SDS al 0,1%.

En otra realización, las moléculas de ácido nucleico relacionadas comprenden o consisten en una secuencia de nucleótidos que tiene al menos una identidad de aproximadamente el 70% con la secuencia de nucleótidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 11, o que comprende o consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 70% con el polipéptido que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8. En realizaciones preferidas, las secuencias de nucleótidos tienen una identidad de aproximadamente el 75 por ciento, o de aproximadamente el 80 por ciento, o de aproximadamente el 85 por ciento, o de aproximadamente el 90 por ciento, o de aproximadamente el 95, 96, 97, 98 ó 99 por ciento con la secuencia de nucleótidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 11, o con las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que tiene una identidad de aproximadamente el 75 por ciento, o de aproximadamente el 80 por ciento, o de aproximadamente el 85 por ciento, o de aproximadamente el 90 por ciento, o de aproximadamente el 95, 96, 97, 98 ó 99 por ciento con la secuencia polipeptídica que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8. Las moléculas de ácido nucleico relacionadas codifican polipéptidos que poseen al menos una actividad del polipéptido que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8.

Las diferencias en la secuencia de ácido nucleico pueden dar como resultado modificaciones conservativas y/o no conservativas de la secuencia de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8.

- 5 Las modificaciones conservativas de la secuencia aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 (y las modificaciones correspondientes en los nucleótidos codificantes) producirán un polipéptido que tenga características funcionales y químicas similares a las de los polipéptidos TSLPR. Por el contrario, pueden realizarse modificaciones sustanciales de las características funcionales y/o químicas de los polipéptidos TSLPR mediante la selección de sustituciones en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID
- 10 N°: 5 o SEC ID N°: 8 que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura de la cadena principal molecular en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) de la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana o (c) del volumen de la cadena lateral.

- 15 Por ejemplo, una "sustitución de aminoácidos conservativa" puede implicar una sustitución de un resto aminoacídico nativo con un resto no nativo de tal modo que se produzca un escaso o ningún efecto sobre la polaridad o la carga del resto aminoacídico en esa posición. Además, cualquier resto nativo en el polipéptido también puede sustituirse con alanina, como se ha descrito anteriormente para la "mutagénesis mediante alanina".

- 20 Las sustituciones de aminoácidos conservativas también incluyen restos aminoacídicos de origen no natural que se incorporan típicamente mediante la síntesis química de péptidos más que por la síntesis en sistemas biológicos. Éstos incluyen peptidomiméticos y otras formas revertidas o invertidas de restos aminoacídicos.

Los restos de origen natural pueden dividirse en clases en base a propiedades comunes de las cadenas laterales:

- 25 1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu e Ile;  
2) hidrófilos neutros: Cys, Ser y Thr;  
3) ácidos: Asp y Glu;  
4) básicos: Asn, Gln, His, Lys y Arg;  
5) restos que influyen en la orientación de la cadena: Gly y Pro; y
- 30 6) aromáticos: Trp, Tyr y Phe.

- Por ejemplo, las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Dichos restos sustituidos pueden introducirse en regiones del polipéptido TSLPR humano que son homólogas con polipéptidos TSLPR no humanos o en las regiones no homólogas de la
- 35 molécula.

- 40 Cuando se realizan dichos cambios, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en base a sus características de hidrofobia y de carga. Los índices hidropáticos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

- 45 Por lo general, se entiende en la técnica la importancia del índice hidropático del aminoácido para conferir una función biológica interactiva a una proteína (Kyte *et al.*, 1982, *J. Mol. Biol.* 157: 105-31). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden sustituir a otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y aún conservar una actividad biológica similar. Al realizar cambios en base al índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están entre  $\pm 2$ , se prefieren particularmente los que están entre  $\pm 1$  y se prefieren aún más particularmente los que están entre  $\pm 0,5$ .
- 50

- También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente en base a la hidrofilia, particularmente cuando se pretende usar la proteína o péptido biológica y funcionalmente equivalente en realizaciones inmunológicas, como en el presente caso. Una mayor hidrofilia media local de una proteína, determinada por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y
- 55 antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

- Se han asignado los siguientes valores de hidrofilia a estos restos aminoacídicos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0  $\pm$  1); glutamato (+3,0  $\pm$  1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5  $\pm$  1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); y triptófano (-3,4). Cuando se realizan cambios en base a valores de hidrofilia similares, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia están dentro de  $\pm 2$ , se prefiere particularmente los que están entre  $\pm 1$  y se prefieren aún más particularmente los que están entre  $\pm 0,5$ . También se pueden identificar epítomos a partir de secuencias de aminoácidos primarias en base a la hidrofilia. Estas regiones también se denominan como "regiones del núcleo epitópico".
- 65

Las sustituciones de aminoácidos deseadas (ya sean conservativas o no conservativas) pueden determinarse por los especialistas en la técnica en el momento en que se deseen dichas sustituciones. Por ejemplo, pueden usarse sustituciones de aminoácidos para identificar restos importantes del polipéptido TSLPR o para aumentar o disminuir la afinidad de los polipéptidos TSLPR que se describen en este documento. En la Tabla I se exponen sustituciones de aminoácidos ejemplares.

5

Tabla I  
Sustituciones de aminoácidos

Restos originales	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, ácido 1,4-diamino-butírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, norleucina	Leu

10 Un especialista en la técnica será capaz de determinar variantes adecuadas del polipéptido que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 usando técnicas bien conocidas. Para identificar zonas adecuadas de la molécula que pueden cambiarse sin sacrificar la actividad biológica, un especialista en la técnica puede dirigirse a zonas que no se piense que son importantes para la actividad. Por ejemplo, cuando se conocen polipéptidos similares con actividades similares de la misma especie o de otra especie, un especialista en la técnica puede comparar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido TSLPR con dichos polipéptidos similares. Con dicha comparación, se pueden identificar restos y porciones de las moléculas que estén conservadas entre polipéptidos similares. Se entenderá que cambios en zonas de la molécula de TSLPR que no están conservadas respecto a dichos polipéptidos similares será menos probable que afecten desfavorablemente a la actividad biológica y/o la estructura de un polipéptido TSLPR. Un especialista en la técnica también sabrá que, aun en regiones relativamente conservadas, se pueden sustituir los restos de origen natural por aminoácidos químicamente similares conservando la actividad (sustituciones de restos aminoacídicos conservativas). Por lo tanto, incluso zonas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden someterse a sustituciones de aminoácidos conservativas sin sacrificar la actividad biológica o sin afectar desfavorablemente a la estructura del polipéptido.

25 Además, un especialista en la técnica puede revisar estudios de estructura-función para identificar restos en polipéptidos similares que sean importantes para la actividad o la estructura. A la vista de dicha comparación, se puede predecir la importancia de restos aminoacídicos en un polipéptido TSLPR que se corresponden con restos aminoacídicos que son importantes para la actividad o estructura en polipéptidos similares. Un especialista en la técnica puede optar por sustituciones de dichos restos aminoacídicos importantes predichos de polipéptidos TSLPR por aminoácidos químicamente similares.

30 Un especialista en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con esa estructura en polipéptidos similares. En vista de dicha información, un especialista en la técnica puede predecir el alineamiento de restos aminoacídicos del polipéptido TSLPR con respecto a su estructura tridimensional. Un especialista en la técnica puede elegir no realizar cambios radicales en restos aminoacídicos que se ha predicho que están en la superficie de la proteína, ya que dichos restos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un especialista en la técnica puede generar variantes de ensayo que contengan una sustitución de un solo aminoácido en cada resto aminoacídico. Las variantes pueden explorarse usando ensayos de actividad conocidos por los especialistas en la técnica. Dichas variantes podrían usarse para recopilar información sobre variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubre que un cambio en un resto aminoacídico en particular da como resultado una actividad suprimida, indeseablemente reducida o inadecuada, se evitarían las variantes con dicho cambio. En otras palabras, basándose en la información recopilada de dichos experimentos de rutina, un especialista en la técnica puede determinar fácilmente los aminoácidos en los que deben evitarse sustituciones adicionales, ya sean en solitario o en combinación con otras mutaciones.

40

- Varias publicaciones científicas se han dedicado a la predicción de la estructura secundaria. Véanse, Moulton, 1996, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7: 422-27; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 13: 222-45; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 113: 211-22; Chou *et al.*, 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47: 45-48; Chou *et al.*, 1978, *Ann. Rev. Biochem.* 47: 251-276; y Chou *et al.*, 1979, *Biophys. J.* 26: 367-84. Además, actualmente están disponibles programas informáticos para facilitar la predicción de la estructura secundaria. Un método para predecir la estructura secundaria se basa en el modelado por homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia superior al 30%, o una similitud superior al 40%, tienen con frecuencia topologías estructurales similares. El reciente crecimiento de la base de datos estructurales de proteínas (PDB) ha proporcionado una predictibilidad mejorada de la estructura secundaria, incluyendo el número potencial de plegamientos dentro de la estructura de un polipéptido o proteína. Véase Holm, *et al.*, 1999, *Nucleic Acids Res.* 27: 244-47. Se ha sugerido que existe un número limitado de plegamientos en un polipéptido o proteína dada y que, una vez que se han resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural se volverá notablemente más precisa (Brenner *et al.*, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 369-76).
- 15 Los métodos adicionales para la predicción de la estructura secundaria incluyen el “enhebrado” (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 377-87; Sippl *et al.*, 1996, *Structure* 4: 15-19), el “análisis del perfil” (Bowie *et al.*, 1991, *Science*, 253: 164-70; Gribskov *et al.*, 1990, *Methods Enzymol.* 183: 146-59; Gribskov *et al.*, 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 4355-58) y la “conexión evolutiva” (Véanse Holm *et al.*, anteriormente, y Brenner *et al.*, anteriormente).
- 20 Las variantes del polipéptido TSLPR preferidas incluyen variantes de glicosilación en las que se ha alterado el número y/o el tipo de sitios de glicosilación en comparación con la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8. En una realización, las variantes del polipéptido TSLPR comprenden un mayor o un menor número de sitios de glicosilación ligados a N que la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8. Un sitio de glicosilación ligado a N está caracterizado por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en la que el resto aminoacídico denominado X puede ser cualquier resto aminoacídico excepto prolina. La sustitución de restos aminoacídicos para generar esta secuencia proporciona un nuevo sitio potencial para la adición de una cadena de hidratos de carbono ligada a N. Como alternativa, las sustituciones que eliminan esta secuencia eliminarán una cadena de hidratos de carbono ligada a N existente. También se describe una reorganización de las cadenas de hidratos de carbono ligadas a N en la que se eliminan uno o más sitios de glicosilación ligados a N (típicamente, los que son de origen natural) y se generan uno o más nuevos sitios ligados a N. Las variantes de TSLPR adicionales incluyen variantes de cisteína, en las que se delecionan o sustituyen uno o más restos de cisteína con otros aminoácidos (por ejemplo, serina) en comparación con la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8. Las variantes de cisteína son útiles cuando los polipéptidos TSLPR tienen que volver a plegarse en una conformación biológicamente activa, tal como después del aislamiento de cuerpos de inclusión insolubles. Las variantes de cisteína tienen, generalmente, menos restos de cisteína que la proteína nativa y, típicamente, tienen un número par para minimizar las interacciones que resultan de cisteínas desemparejadas.
- 40 Las moléculas de ácido nucleico relacionadas comprenden o consisten en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido, como se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8, con al menos una inserción de un aminoácido y en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8, o una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido, como se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8, con al menos una delección de un aminoácido y en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8. Las moléculas de ácido nucleico relacionadas también comprenden o consisten en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido, como se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8, en la que el polipéptido tiene un truncamiento carboxilo-terminal y/o amino-terminal y en la que además el polipéptido tiene una actividad del polipéptido que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8. Las moléculas de ácido nucleico relacionadas también comprenden o consisten en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido, como se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8, con al menos una modificación seleccionada del grupo constituido por sustituciones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, delecciones de aminoácidos, truncamientos carboxilo-terminales y truncamientos amino-terminales y en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8.
- 55 Además, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 u otro polipéptido TSLPR, puede fusionarse con un polipéptido homólogo para formar un homodímero o con un polipéptido heterólogo para formar un heterodímero. Los péptidos y polipéptidos heterólogos incluyen, pero sin limitación: un epítipo para permitir la detección y/o el aislamiento de un polipéptido de fusión de TSLPR; una proteína receptora transmembrana o una porción de la misma, tal como un dominio extracelular o un dominio transmembrana e intracelular; un ligando o una porción del mismo que se una a una proteína receptora transmembrana; una enzima o una porción de la misma que sea catalíticamente activa; un polipéptido o péptido que promueva la oligomerización, tal como un dominio de cremallera de leucina; un polipéptido o péptido que aumente la estabilidad, tal como una región constante de inmunoglobulina; y un polipéptido que tenga una actividad terapéutica diferente de la del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 u otro polipéptido TSLPR.

Pueden realizarse fusiones en el extremo amino-terminal o en el extremo carboxilo-terminal del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 u otro polipéptido TSLPR. Las fusiones pueden ser directas, sin ninguna molécula enlazadora o adaptadora, o pueden ser mediante una molécula enlazadora o adaptadora. Una molécula enlazadora o adaptadora puede tener uno o más restos aminoácidos, típicamente, de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 restos aminoácidos. Una molécula enlazadora o adaptadora también puede diseñarse con un sitio de escisión para una endonucleasa de restricción de ADN o para una proteasa para permitir la separación de los restos fusionados. Se entenderá que una vez construidos, los polipéptidos de fusión pueden derivatizarse de acuerdo con los métodos que se describen en este documento.

En este documento se describe el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 u otro polipéptido TSLPR se fusiona con uno o más dominios de una región Fc de IgG humana. Los anticuerpos comprenden dos partes funcionalmente independientes, un dominio variable conocido como "Fab", que se une a un antígeno, y un dominio constante conocido como "Fc", que está implicado en funciones efectoras tales como la activación del complemento y el ataque mediante células fagocíticas. Una Fc tiene una larga vida media en suero, mientras que una Fab tiene una vida media más corta. Capon *et al.*, 1989, *Nature* 337: 525-31. Cuando se construyen junto con una proteína terapéutica, un dominio Fc puede proporcionar una vida media más larga o incorporar funciones como la unión a un receptor de Fc, la unión a proteína A, la fijación del complemento y, quizá, incluso la transferencia placentaria. Ídem. La Tabla II resume el uso de ciertas fusiones con Fc conocidas en la técnica.

Tabla II  
Fusión de Fc con proteínas terapéuticas

Forma de Fc	Compañero de fusión	Implicaciones terapéuticas	Bibliografía
IgG1	Extremo N-terminal de CD30-L	Enfermedad de Hodgkin; linfoma anaplásico; leucemia de células T	Patente de EE.UU. N° 5.480.981
Fcγ2a murina	IL-10	antiinflamatoria; rechazo de trasplantes	Zheng <i>et al.</i> , 1995, <i>J. Immunol.</i> 154: 5590-600
IgG1	Receptor de TNF	choque séptico	Fisher <i>et al.</i> , 1996, <i>N. Engl. J. Med.</i> 334: 1697-1702; Van Zee <i>et al.</i> , 1996, <i>J. Immunol.</i> 156: 2221-30
IgG, IgA, IgM o IgE (excluyendo el primer dominio)	Receptor de TNF	inflamación, trastornos autoinmunes	Patente de EE.UU. N° 5.808.029
IgG1	Receptor de CD4	SIDA	Capon <i>et al.</i> , 1989, <i>Nature</i> 337: 525-31
IgG1, IgG3	Extremo N-terminal de IL-2	anticancerosa, antiviral	Harvill <i>et al.</i> , 1995, <i>Immunotech.</i> 1: 95-105
IgG1	Extremo C-terminal de OPG	artrosis; densidad ósea	Documento WO 97/23614
IgG1	Extremo N-terminal de leptina	anti-obesidad	Documento PCT/US 97/23183, presentado el 11 de diciembre de 1997
IgCγ1 humana	CTLA-4	trastornos autoinmunes	Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> 174: 561-69

En un ejemplo, una región bisagra, CH2 y CH3 de IgG humana puede fusionarse en el extremo amino-terminal o carboxilo-terminal de los polipéptidos TSLPR usando métodos conocidos por los especialistas en la técnica. En otro ejemplo, una región bisagra, CH2 y CH3 de IgG humana puede fusionarse en el extremo amino-terminal o carboxilo-terminal de un fragmento del polipéptido TSLPR (por ejemplo, la porción extracelular predicha del polipéptido TSLPR).

El polipéptido de fusión de TSLPR resultante puede purificarse mediante el uso de una columna de afinidad de Proteína A. Se ha descubierto que los péptidos y proteínas fusionados con una región Fc presentan una vida media sustancialmente más larga *in vivo* que los equivalentes no fusionados. Además, una fusión con una región Fc permite la dimerización/multimerización del polipéptido de fusión. La región Fc puede ser una región Fc de origen natural o puede modificarse para mejorar ciertas cualidades, tales como las cualidades terapéuticas, el tiempo de circulación o una agregación reducida.

La identidad y la similitud de moléculas de ácido nucleico y polipéptidos relacionadas se calculan fácilmente por métodos conocidos. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, los que se describen en *Computational Molecular Biology* (A. M. Lesk, ed., Oxford University Press 1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (D. W. Smith, ed., Academic Press 1993); *Computer Analysis of Sequence Data* (Parte I, A. M. Griffin y H. G. Griffin, eds.,

Humana Press 1994); G. von Heinle, *Sequence Analysis in Molecular Biology* (Academic Press 1987); *Sequence Analysis Primer* (M. Gribskov y J. Devereux, eds., M. Stockton Press 1991); y Carrillo *et al.*, 1988, *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073.

5 Se diseñan métodos preferidos para determinar la identidad y/o la similitud para dar el mayor emparejamiento posible entre las secuencias que se analizan. Se describen métodos para determinar la identidad y la similitud en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y la similitud entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, el paquete de programas GCG, que incluye GAP (Devereux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Res.* 12: 387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215: 403-10). El programa BLASTX está disponible públicamente del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) y otras fuentes (Altschul *et al.*, *BLAST Manual* (NCB NLM NIH, Bethesda, MD); Altschul *et al.*, 1990, anteriormente). También puede usarse el bien conocido algoritmo de Smith Waterman para determinar la identidad.

15 Ciertos programas de alineamiento para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado el emparejamiento de sólo una región corta de las dos secuencias, y esta pequeña región alineada puede tener una identidad de secuencia muy elevada aunque no exista una relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. Por consiguiente, en una realización preferida, el método de alineamiento seleccionado (programa GAP) dará como resultado un alineamiento que abarque al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido de consulta.

20 Por ejemplo, usando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, WI), dos polipéptidos para los que hay que determinar el porcentaje de identidad de secuencia se alinean para un emparejamiento óptimo de sus respectivos aminoácidos (el "espacio de alineamiento", determinado por el algoritmo). Se usan junto con el algoritmo una penalización por apertura de huecos (que se calcula como 3X la diagonal media; la "diagonal media" es la media de la diagonal de la matriz de comparación que se usa; la "diagonal" es la puntuación o número que se asigna a cada emparejamiento de aminoácidos perfecto por la matriz de comparación en particular) y una penalización por extensión de huecos (que es habitualmente 0,1X la penalización por apertura de huecos), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62. El algoritmo también usa una matriz de comparación convencional (véanse, Dayhoff *et al.*, *5 Atlas of Protein Sequence and Structure* (Supl. 3 1978) (matriz de comparación PAM250); Henikoff *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89: 10915-19 (matriz de comparación BLOSUM 62).

Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias polipeptídicas incluyen los siguientes:

35 Algoritmo: Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48: 443-53;  
Matriz de comparación: BLOSUM 62 (Henikoff *et al.*, anteriormente);  
Penalización por huecos: 12  
Penalización por longitud de huecos: 4  
Umbral de similitud: 0

40 El programa GAP es útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de polipéptidos (junto con ninguna penalización para huecos terminales) usando el algoritmo GAP.

45 Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias de moléculas de ácido nucleico incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman y Wunsch, anteriormente;  
Matriz de comparación: emparejamientos = +10, emparejamientos erróneos = 0  
50 Penalización por huecos: 50  
Penalización por longitud de huecos: 3

El programa GAP también es útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de moléculas de ácido nucleico.

55 Pueden usarse otros algoritmos ejemplares, penalizaciones por apertura de huecos, penalizaciones por extensión de huecos, matrices de comparación y umbrales de similitud, incluyendo los que se describen en el manual del programa Wisconsin Package, versión 9, septiembre de 1997. Las selecciones en particular a realizar serán evidentes para los especialistas en la técnica y dependerán de la comparación específica a realizar, tal como ADN contra ADN, proteína contra proteína, proteína contra ADN; y, además, de si la comparación es entre parejas de secuencias dadas (en cuyo caso se prefieren generalmente GAP o BestFit) o entre una secuencia y una gran base de datos de secuencias (en cuyo caso se prefieren FASTA o BLASTA).

Moléculas de ácido nucleico

Las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de un polipéptido TSLPR pueden obtenerse fácilmente de una diversidad de formas que incluyen, sin limitación, síntesis química, exploración de una genoteca genómica o de ADNc, exploración de una genoteca de expresión y/o amplificación por PCR de ADNc.

Los métodos de ADN recombinante que se usan en este documento son generalmente los que se describen en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) y/o *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. y Wiley and Sons, 1994). Se describen en este documento para moléculas de ácido nucleico como se describen en este documento, y métodos para obtener dichas moléculas.

Cuando se ha identificado un gen que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido TSLPR de una especie, puede usarse todo o una porción de ese gen como sonda para identificar genes ortólogos o relacionados de la misma especie. Las sondas o cebadores pueden usarse para explorar genotecas de ADNc de diversas fuentes de tejido que se piensa que expresan el polipéptido TSLPR. Además, puede usarse una parte o toda una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia que se muestra en cualquiera de las SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 11 para explorar una genoteca genómica para identificar y aislar un gen que codifique la secuencia de aminoácidos de un polipéptido TSLPR. Típicamente, se emplearán condiciones de rigurosidad moderada o alta para la exploración para minimizar el número de falsos positivos que se obtienen en la exploración.

También pueden identificarse moléculas de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos de polipéptidos TSLPR mediante la clonación y expresión, que emplea la detección de clones positivos en base a una propiedad de la proteína expresada. Típicamente, las genotecas de ácidos nucleicos se exploran mediante la unión de un anticuerpo u otro compañero de unión (por ejemplo, receptor o ligando) con proteínas clonadas que se expresan y se presentan en la superficie de una célula hospedadora. El anticuerpo o compañero de unión se modifica con un marcador detectable para identificar las células que expresan el clon deseado.

Pueden seguirse las técnicas de expresión recombinante, llevadas a cabo de acuerdo con las descripciones que se exponen a continuación, para producir estos polinucleótidos y para expresar los polipéptidos codificados. Por ejemplo, mediante la inserción de una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido TSLPR en un vector apropiado, un especialista en la técnica puede producir fácilmente grandes cantidades de la secuencia de nucleótidos deseada. Después, las secuencias pueden usarse para generar sondas de detección o cebadores de amplificación. Como alternativa, puede insertarse un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido TSLPR en un vector de expresión. Mediante la introducción del vector de expresión en un hospedador apropiado, el polipéptido TSLPR codificado puede producirse en grandes cantidades.

Otro método para obtener una secuencia de ácido nucleico adecuada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este método, se prepara el ADNc a partir del ARN poli(A)+ o ARN total usando la enzima transcriptasa inversa. Después, se añaden dos cebadores, típicamente complementarios a dos regiones distintas del ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido TSLPR, al ADNc junto una polimerasa tal como polimerasa *Taq* y la polimerasa amplifica la región de ADNc entre los dos cebadores.

Otro medio para preparar una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido TSLPR es la síntesis química usando métodos bien conocidos por los especialistas en la técnica, tales como los que se describen en Engels *et al.*, 1989, *Angew. Chem. Intl. Ed.* 28: 716-34. Estos métodos incluyen, entre otros, los métodos del fosfotriéster, de la fosforamidita y del H-fosfonato para la síntesis de ácidos nucleicos. Un método preferido para dicha síntesis química es la síntesis sobre soportes de polímero usando química de fosforamidita convencional. Típicamente, el ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido TSLPR tendrá varios cientos de nucleótidos de longitud. Pueden sintetizarse ácidos nucleicos más largos de aproximadamente 100 nucleótidos como varios fragmentos usando estos métodos. Después, los fragmentos pueden ligarse para juntos formar la secuencia de nucleótidos de longitud completa de un gen de TSLPR. Habitualmente, el fragmento de ADN que codifica el extremo amino-terminal del polipéptido tendrá un ATG, que codifica un resto de metionina. Esta metionina puede o no estar presente en la forma madura del polipéptido TSLPR, dependiendo de si el polipéptido producido en la célula hospedadora está diseñado para secretarse por esa célula. También pueden usarse otros métodos conocidos por los especialistas.

En algunas realizaciones, las variantes de ácido nucleico contienen codones que se han alterado para una expresión óptima de un polipéptido TSLPR en una célula hospedadora dada. Las alteraciones de codones en particular dependerán del polipéptido TSLPR y de la célula hospedadora seleccionada para la expresión. Dicha "optimización de codones" puede realizarse por una diversidad de métodos, por ejemplo, mediante la selección de codones que se prefieren para su uso en genes altamente expresados en una célula hospedadora dada. Pueden usarse algoritmos informáticos que incorporan tablas de frecuencia de codones, tales como "Eco\_high.Cod" para preferencia de

codones de genes bacterianos altamente expresados, y se proporcionan en el University of Wisconsin Package Versión 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI). Otras tablas de frecuencia de codones útiles incluyen “Celegans\_high.cod”, “Celegans\_low.cod”, “Drosophila\_high.cod”, “Human\_high.cod”, “Maize\_high.cod” y “Yeast\_high.cod”.

5 En algunos casos, puede ser deseable preparar moléculas de ácido nucleico que codifiquen variantes de polipéptidos TSLPR. Pueden producirse moléculas de ácido nucleico que codifiquen variantes usando mutagénesis dirigida, amplificación por PCR u otros métodos apropiados en los que el cebador o cebadores tengan las mutaciones puntuales deseadas (véanse, Sambrook *et al.*, anteriormente, y Ausubel *et al.*, anteriormente, para descripciones de las técnicas de mutagénesis). También puede usarse la síntesis química, mediante el uso de métodos que se describen en Engels *et al.*, anteriormente, para preparar dichas variantes. También pueden usarse otros métodos conocidos por los especialistas.

#### 15 Vectores y células hospedadoras

Una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido TSLPR se inserta en un vector de expresión apropiado usando técnicas de ligamiento convencionales. Típicamente, el vector se selecciona para que sea funcional en la célula hospedadora en particular que se emplea (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula hospedadora de tal modo que pueda producirse la amplificación del gen y/o la expresión del gen). Una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido TSLPR puede amplificarse o expresarse en células hospedadoras procariotas, de levaduras, de insectos (sistemas de baculovirus) y/o eucariotas. La selección de la célula hospedadora dependerá en parte de si el polipéptido TSLPR debe modificarse postraduccionalmente (por ejemplo, glicosilarse y/o fosforilarse). Si es así, son preferibles células hospedadoras de levaduras, insectos o mamíferos. Para una revisión sobre vectores de expresión, véase *Meth. Enz.*, vol. 185 (D. V. Goeddel, ed., Academic Press 1990).

Típicamente, los vectores de expresión que se usan en cualquiera de las células hospedadoras contendrán secuencias para el mantenimiento de plásmidos y para la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos exógenas. Dichas secuencias, denominadas en conjunto como “secuencias flanqueantes” incluirán típicamente en ciertas realizaciones una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación de la transcripción, una secuencia intrónica completa que contiene un sitio donante y aceptor de corte y empalme, una secuencia que codifica una secuencia líder para la secreción del polipéptido, un sitio de unión al ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región polienlazadora para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido a expresar y un elemento marcador de selección. Cada una de estas secuencias se describe a continuación.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia codificante de un “marcador”, es decir, una molécula oligonucleotídica localizada en el extremo 5' o 3' de la secuencia codificante del polipéptido TSLPR; la secuencia oligonucleotídica codifica poliHis (tal como hexaHis) u otro “marcador”, tal como FLAG, HA (hemaglutinina de virus influenza) o *myc*, para las que existen anticuerpos disponibles en el mercado. Este marcador se fusiona típicamente con el polipéptido tras la expresión del polipéptido y puede servir como medio para la purificación por afinidad del polipéptido TSLPR a partir de la célula hospedadora. La purificación por afinidad puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante una cromatografía en columna usando anticuerpos contra el marcador como matriz de afinidad. Opcionalmente, el marcador puede eliminarse posteriormente del polipéptido TSLPR purificado por diversos medios tales como el uso de ciertas peptidasas para la escisión.

Las secuencias flanqueantes pueden ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula hospedadora), heterólogas (es decir, de una especie distinta a la especie o cepa de la célula hospedadora), híbridas (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes de más de una fuente) o sintéticas, o las secuencias flanqueantes pueden ser secuencias nativas que funcionan normalmente para regular la expresión del polipéptido TSLPR. Así, la fuente de una secuencia flanqueante puede ser cualquier organismo procariota o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado o cualquier planta, con tal de que la secuencia flanqueante sea funcional en, y pueda activarse por, la maquinaria de la célula hospedadora.

55 Pueden obtenerse secuencias flanqueantes útiles en los vectores de esta invención por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Típicamente, las secuencias flanqueantes útiles en este documento —distintas de las secuencias flanqueantes del gen de TSLPR— se habrán identificado previamente mediante mapeo y/o digestión con endonucleasas de restricción y, por lo tanto, pueden aislarse de la fuente de tejido apropiada usando las endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, puede conocerse la secuencia de nucleótidos completa de una secuencia flanqueante. En este caso, la secuencia flanqueante puede sintetizarse usando los métodos que se describen en este documento para la síntesis o clonación de ácidos nucleicos.

65 Cuando se conoce toda o sólo una porción de la secuencia flanqueante, ésta puede obtenerse mediante el uso de PCR y/o mediante exploración de una genoteca genómica con un oligonucleótido y/o fragmento de secuencia flanqueante adecuado de la misma o de otra especie. Cuando no se conoce la secuencia flanqueante, puede aislarse un fragmento de ADN que contiene una secuencia flanqueante a partir de un fragmento más largo de ADN

que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso otro gen o genes. El aislamiento puede llevarse a cabo mediante la digestión con endonucleasas de restricción para producir el fragmento de ADN apropiado, seguida del aislamiento usando purificación en gel de agarosa, cromatografía en columna Qiagen® (Chatsworth, CA) u otros métodos conocidos por los especialistas. La selección de enzimas adecuadas para lograr este fin será fácilmente evidente para un especialista en la técnica.

Un origen de replicación es, típicamente, una parte de esos vectores de expresión procariotas que se adquieren en el mercado y el origen contribuye a la amplificación del vector en una célula hospedadora. La amplificación del vector hasta cierto número de copias puede ser, en algunos casos, importante para la expresión óptima de un polipéptido TSLPR. Si el vector de elección no contiene un sitio de origen de replicación, puede sintetizarse uno químicamente basándose en una secuencia conocida y ligarse en el vector. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de bacterias gram-negativas y diversos orígenes (por ejemplo, de SV40, polioma, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV) o papilomavirus, tales como HPV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos. Generalmente, no se necesita el componente de origen de replicación para los vectores de expresión de mamíferos (por ejemplo, el origen de SV40 se usa frecuentemente sólo porque contiene el promotor temprano).

Una secuencia de terminación de la transcripción se localiza típicamente 3' al extremo de una región codificante de un polipéptido y sirve para terminar la transcripción. Habitualmente, una secuencia de terminación de la transcripción en células procariotas es un fragmento rico en G-C seguido por una secuencia poli-T. Aunque la secuencia se clona fácilmente a partir de una genoteca o incluso se adquiere en el mercado como parte de un vector, también puede sintetizarse fácilmente usando métodos para la síntesis de ácidos nucleicos como los que se describen en este documento.

Un elemento génico marcador de selección codifica una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula hospedadora que se cultiva en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, tetraciclina o kanamicina para células hospedadoras procariotas; (b) complementan deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de los medios complejos. Los marcadores de selección preferidos son el gen de resistencia a kanamicina, el gen de resistencia a ampicilina y el gen de resistencia a tetraciclina. También puede usarse un gen de resistencia a neomicina para la selección en células hospedadoras procariotas y eucariotas.

Pueden usarse otros genes de selección para amplificar el gen que se expresará. La amplificación es el proceso por el que los genes que más se demandan para la producción de una proteína crítica para el crecimiento se repiten en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Los ejemplos de marcadores de selección adecuados para células de mamíferos incluyen la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la timidina quinasa. Las células de mamífero transformantes se colocan en condiciones de presión de selección en las que sólo las transformantes están excepcionalmente adaptadas para sobrevivir en virtud del gen de selección presente en el vector. La presión de selección se impone mediante el cultivo de las células transformadas en condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio se cambia sucesivamente, conduciendo de este modo a la amplificación tanto del gen de selección como del ADN que codifica un polipéptido TSLPR. Como resultado, se sintetizan cantidades aumentadas de polipéptido TSLPR a partir del ADN amplificado.

Habitualmente es necesario un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción del ARNm y se caracteriza por una secuencia de Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia de Kozak (eucariotas). Típicamente, el elemento se localiza en posición 3' al promotor y 5' a la secuencia codificante de un polipéptido TSLPR a expresar. La secuencia de Shine-Dalgarno es variada, pero típicamente es una polipurina (es decir, que tiene un contenido elevado de A-G). Se han identificado muchas secuencias de Shine-Dalgarno, cada una de las cuales puede sintetizarse fácilmente, usando métodos que se describen en este documento, y usarse en un vector procariota.

Puede usarse una secuencia líder o de señal para dirigir un polipéptido TSLPR hacia el exterior de la célula hospedadora. Típicamente, una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de señal está colocada en la región codificante de una molécula de ácido nucleico de TSLPR o directamente en el extremo 5' de una región codificante de un polipéptido TSLPR. Se han identificado muchas secuencias de señal y puede usarse cualquiera de ellas que sea funcional en la célula hospedadora seleccionada junto con una molécula de ácido nucleico de TSLPR. Por lo tanto, una secuencia de señal puede ser homóloga (de origen natural) o heteróloga a la molécula de ácido nucleico de TSLPR. Además, una secuencia de señal puede sintetizarse químicamente usando métodos que se describen en este documento. En la mayoría de los casos, la secreción de un polipéptido TSLPR a partir de la célula hospedadora a través de la presencia de un péptido señal dará como resultado la eliminación del péptido señal del polipéptido TSLPR secretado. La secuencia de señal puede ser un componente del vector o puede ser una parte de una molécula de ácido nucleico de TSLPR que se inserta en el vector.

Se describe en este documento el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de señal nativa del polipéptido TSLPR unida a una región codificante del polipéptido TSLPR o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de señal heteróloga unida a una región codificante del polipéptido TSLPR. La secuencia de señal heteróloga seleccionada debería ser una que se reconozca y se procese, es decir, se escinda, por una

peptidasa de señal por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan la secuencia de señal nativa del polipéptido TSLPR, la secuencia de señal se sustituye por una secuencia de señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de los líderes de la fosfatasa alcalina, la penicilinasasa o la enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levaduras, la secuencia de señal nativa del polipéptido TSLPR puede sustituirse por los líderes de la invertasa, del factor alfa o de la fosfatasa ácida de levaduras. En la expresión de células de mamíferos, la secuencia de señal nativa es adecuada, aunque pueden ser adecuadas otras secuencias de señal de mamíferos.

En algunos casos, tales como en los que se desea la glicosilación en un sistema de expresión de célula hospedadora eucariota, se pueden manipular las diversas presecuencias para mejorar la glicosilación o el rendimiento. Por ejemplo, se puede alterar el sitio de escisión de la peptidasa de un péptido señal en particular o añadir presecuencias que también pueden afectar a la glicosilación. El producto proteico final puede tener, en la posición -1 (con respecto al primer aminoácido de la proteína madura) uno o más aminoácidos inherentes a la expresión que pueden no haberse eliminado totalmente. Por ejemplo, el producto proteico final puede tener uno o dos restos aminoacídicos que se encuentran en el sitio de escisión de la peptidasa, unidos al extremo amino-terminal. Como alternativa, el uso de algunos sitios de escisión enzimática puede dar como resultado una forma ligeramente truncada del polipéptido TSLPR deseado si la enzima corta en dicha zona dentro del polipéptido maduro.

En muchos casos, la transcripción de una molécula de ácido nucleico se aumenta por la presencia de uno o más intrones en el vector; esto es particularmente cierto cuando se produce un polipéptido en células hospedadoras eucariotas, especialmente en células hospedadoras de mamíferos. Los intrones que se usan pueden ser de origen natural dentro del gen de TSLPR, especialmente cuando el gen que se usa es una secuencia genómica de longitud completa o un fragmento de la misma. Cuando el intrón no es de origen natural dentro del gen (como para la mayoría de los ADNc), el intrón puede obtenerse de otra fuente. Generalmente, la posición del intrón con respecto a las secuencias flanqueantes y al gen de TSLPR es importante, ya que el intrón debe transcribirse para que sea eficaz. Por lo tanto, cuando se transcribe una molécula de ADNc de TSLPR, la posición preferida para el intrón es 3' al sitio de inicio de la transcripción y 5' a la secuencia de terminación de la transcripción poli-A. Preferiblemente, el intrón o intrones se localizarán a un lado o al otro (es decir, 5' o 3') del ADNc, de tal modo que no interrumpen la secuencia codificante. Puede usarse cualquier intrón de cualquier fuente, incluyendo organismos virales, procariotas y eucariotas (plantas o animales) para la práctica de esta invención, con tal de que sea compatible con la célula hospedadora en la que se inserta. También se incluyen en este documento intrones sintéticos. Opcionalmente, puede usarse más de un intrón en el vector.

Típicamente, los vectores de expresión y clonación de la presente invención contendrán un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y que está unido operativamente a la molécula que codifica el polipéptido TSLPR. Los promotores son secuencias que no se transcriben que se localizan cadena arriba (es decir, 5') al codón de inicio de un gen estructural (generalmente, dentro de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan convencionalmente en una de dos clases: promotores inducibles y promotores constitutivos. Los promotores inducibles inician niveles aumentados de transcripción del ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tal como la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. Los promotores constitutivos, por otro lado, inician una producción continua del producto génico; es decir, hay escaso o ningún control sobre la expresión génica. Se conocen un gran número de promotores, que son reconocidos por una diversidad de células hospedadoras potenciales. Un promotor adecuado se une operativamente al ADN que codifica el polipéptido TSLPR mediante la eliminación del promotor del ADN fuente por digestión con enzimas de restricción y la inserción de la secuencia promotora deseada en el vector. La secuencia promotora nativa de TSLPR puede usarse para dirigir la amplificación y/o expresión de una molécula de ácido nucleico de TSLPR. Sin embargo, se prefiere un promotor heterólogo si permite una mayor transcripción y mayores rendimientos de la proteína expresada en comparación con el promotor nativo y si es compatible con el sistema de célula hospedadora que se ha seleccionado para usar.

Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen los sistemas promotores de la beta-lactamasa y la lactosa; de la fosfatasa alcalina; un sistema promotor del triptófano (trp); y promotores híbridos tales como el promotor tac. También son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Sus secuencias se han publicado, permitiendo de este modo que un especialista en la técnica pueda ligarlos con la secuencia de ADN deseada, usando enlazadores o adaptadores cuando sea necesario para suministrar cualquier sitio de restricción útil.

También se conocen bien en la técnica promotores adecuados para su uso con hospedadores de levaduras. Se usan ventajosamente potenciadores de levaduras con promotores de levaduras. Se conocen bien promotores adecuados para su uso con células hospedadoras de mamíferos e incluyen, pero sin limitación, los que se obtienen de los genomas de virus tales como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tales como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B y, más preferiblemente, virus de los simios 40 (SV40). Otros promotores de mamíferos adecuados incluyen promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, promotores de choque térmico y el promotor de la actina.

Los promotores adicionales que pueden ser de interés para controlar la expresión génica de TSLPR incluyen, pero sin limitación: la región promotora temprana de SV40 (Bernoist y Chambon, 1981, *Nature* 290: 304-10); el promotor de CMV; el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, *et al.*, 1980, *Cell* 22: 787-97); el promotor de la timidina quinasa de herpes (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 1444-45); las secuencias reguladoras del gen de la metalotionina (Brinster *et al.*, 1982, *Nature* 296: 39-42); de vectores de expresión procariotas, tales como el promotor de la beta-lactamasa (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75: 3727-31); o el promotor tac (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 21-25). También son de interés las siguientes regiones de control de la transcripción en animales, que presentan especificidad de tejido y que se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen de la elastasa I, que es activa en células acinares pancreáticas (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38: 639-46; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50: 399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7: 425-515); la región de control del gen de la insulina, que es activa en células pancreáticas beta (Hanahan, 1985, *Nature* 315: 115-22); la región de control del gen de la inmunoglobulina, que es activa en células linfoides (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38: 647-58; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318: 533-38; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7: 1436-44); la región de control del virus del tumor mamario del ratón, que es activa en células testiculares, mamarias, linfoides y mastocitos (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45: 485-95); la región de control del gen de la albúmina, que es activa en hígado (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1: 268-76); la región de control del gen de la alfa-fetoproteína, que es activa en hígado (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5: 1639-48; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 235: 53-58); la región de control del gen de la alfa 1-antitripsina, que es activa en el hígado (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1: 161-71); la región de control del gen de la beta-globina, que es activa en células mieloides (Mogram *et al.*, 1985, *Nature* 315: 338-40; Kollias, *et al.*, 1986, *Cell* 46: 89-94); la región de control del gen de la proteína básica de mielina, que es activa en células oligodendrocíticas del cerebro (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48: 703-12); la región de control del gen de la cadena ligera-2 de la miosina, que es activa en músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314: 283-86); y la región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropinas, que es activa en el hipotálamo (Mason *et al.*, 1986, *Science* 234: 1372-78).

Puede insertarse una secuencia potenciadora en el vector para aumentar la transcripción de un ADN que codifica un polipéptido TSLPR de la presente invención por eucariotas superiores. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, habitualmente de aproximadamente 10-300 pb de longitud, que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción. Los potenciadores son relativamente independientes de la orientación y de la posición. Se han localizado en posición 5' y 3' a la unidad de transcripción. Se conocen varias secuencias potenciadoras disponibles de genes de mamíferos (por ejemplo, de la globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína e insulina). Sin embargo, típicamente, se usará un potenciador de un virus. Son elementos potenciadores ejemplares para la activación de promotores eucariotas el potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador del poliovirus y potenciadores de adenovirus. Aunque un potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' a una molécula de ácido nucleico de TSLPR, típicamente se localiza en un sitio en posición 5' al promotor.

Pueden construirse vectores de expresión de la invención a partir de un vector de partida, tal como un vector disponible en el mercado. Dichos vectores pueden contener o no todas las secuencias flanqueantes deseadas. Aunque no estén ya presentes en el vector una o más de las secuencias flanqueantes que se describen en este documento, pueden obtenerse individualmente y ligarse en el vector. Un especialista en la técnica conoce bien métodos que se usan para obtener cada una de las secuencias flanqueantes.

Los vectores preferidos para la práctica de esta invención son los que son compatibles con células hospedadoras bacterianas, de insectos y de mamíferos. Dichos vectores incluyen, entre otros, pCRII, pCR3 y pcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA), pBSII (Stratagene, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII, Invitrogen), pDSR-alfa (Publicación PCT N° WO 90/14363) y pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY).

Los vectores adecuados adicionales incluyen, pero sin limitación, cósmidos, plásmidos o virus modificados, pero se entenderá que el sistema de vector debe ser compatible con la célula hospedadora seleccionada. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, plásmidos tales como derivados del plásmido Bluescript® (un fagémido basado en ColE1 de elevado número de copias, Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA), plásmidos de clonación por PCR diseñados para clonar productos de PCR amplificados con Taq (por ejemplo, TOPO™ TA Cloning® Kit y derivados del plásmido PCR2.1®, Invitrogen) y vectores de mamíferos, levaduras o virus tales como un sistema de expresión de baculovirus (derivados del plásmido pBacPAK, Clontech).

Después de que se haya construido el vector y se haya insertado una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido TSLPR en el sitio apropiado del vector, el vector final puede insertarse en una célula hospedadora adecuada para la amplificación y/o expresión del polipéptido. La transformación de un vector de expresión para un polipéptido TSLPR en una célula hospedadora seleccionada puede llevarse a cabo mediante métodos bien conocidos que incluyen métodos tales como transfección, infección, cloruro cálcico, electroporación, microinyección, lipofección, método dextrano-DEAE u otras técnicas conocidas. El método seleccionado estará en parte en función del tipo de célula hospedadora a usar. Estos métodos y otros métodos adecuados se conocen bien por los especialistas y se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, anteriormente.

Las células hospedadoras pueden ser células hospedadoras procariotas (tales como *E. coli*) o células hospedadoras eucariotas (tales como células de levaduras, insectos o vertebrados). La célula hospedadora, cuando se cultiva en condiciones apropiadas, sintetiza un polipéptido TSLPR que puede recogerse posteriormente del medio de cultivo (si la célula hospedadora lo secreta al medio) o directamente a partir de la célula hospedadora que lo produce (si no se secreta). La selección de una célula hospedadora apropiada dependerá de diversos factores, tales como los niveles de expresión deseados, las modificaciones del polipéptido que son deseables o necesarias para su actividad (tales como glicosilación o fosforilación) y la facilidad para pegarse en una molécula biológicamente activa.

Se conocen en la técnica varias células hospedadoras adecuadas y muchas están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, células de mamíferos, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células CHO DHFR(-) (Urlaub *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 4216-20), células embrionarias de riñón humano (HEK) 293 o 293T o células 3T3. La selección de células hospedadoras de mamífero adecuadas y los métodos para la transformación, cultivo, amplificación, selección, producción de producto y purificación, se conocen en la técnica. Otras líneas celulares de mamíferos adecuadas son las líneas celulares de mono COS-1 y COS-7 y la línea celular CV-1. Las células hospedadoras de mamíferos ejemplares adicionales incluyen líneas celulares de primates y líneas celulares de roedores, incluyendo líneas celulares transformadas. También son adecuadas células diploides normales, cepas celulares procedentes de cultivos *in vitro* de tejidos primarios, así como explantes primarios. Las células candidatas pueden ser genotípicamente deficientes en el gen de selección o pueden contener un gen de selección que actúe de forma dominante. Otras líneas celulares de mamíferos adecuadas incluyen, pero sin limitación, células N2A de neuroblastoma de ratón, HeLa, células L-929 de ratón, líneas 3T3 procedentes de ratones Swiss, Balb-c o NIH y líneas celulares de hámster BHK o HaK. Cada una de estas líneas celulares se conoce y está disponible para los especialistas en la técnica de la expresión de proteínas.

Las células bacterianas son útiles de una forma similar como células hospedadoras adecuadas para la presente invención. Por ejemplo, las diversas cepas de *E. coli* (por ejemplo, HB101, DH5 $\alpha$ , DH10 y MC1061) se conocen bien como células hospedadoras en el campo de la biotecnología. También pueden emplearse en este método diversas cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas spp.*, otros *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.* y similares.

También están disponibles muchas cepas de células de levaduras conocidas por los especialistas en la técnica como células hospedadoras para la expresión de los polipéptidos de la presente invención. Las células de levaduras preferidas incluyen, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

Además, cuando se desee, puede utilizarse sistemas de células de insecto en los métodos de la presente invención. Dichos sistemas se describen en, por ejemplo, Kitts *et al.*, 1993, *Biotechniques*, 14: 810-17; Lucklow, 1993, *Curr. Opin. Biotechnol.* 4: 564-72; y Lucklow *et al.*, 1993, *J Virol.*, 67: 4566-79. Las células de insecto preferidas son Sf-9 y Hi5 (Invitrogen).

También se pueden usar animales transgénicos para expresar polipéptidos TSLPR glicosilados. Por ejemplo, se puede usar un animal transgénico que produzca leche (una vaca o cabra, por ejemplo) y obtener el presente polipéptido glicosilado en la leche del animal. También se pueden usar plantas para producir polipéptidos TSLPR, sin embargo, en general, la glicosilación que se produce en plantas es diferente de la que se produce en células de mamíferos y puede dar como resultado un producto glicosilado que no sea adecuado para uso terapéutico en humanos.

#### 45 Producción de polipéptidos

Las células hospedadoras que comprenden un vector de expresión del polipéptido TSLPR pueden cultivarse usando medios convencionales bien conocidos por los especialistas. Los medios contendrán habitualmente todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y la supervivencia de las células. Los medios adecuados para el cultivo de células de *E. coli* incluyen, por ejemplo, caldo de Luria (LB) y/o caldo Terrific (TB). Los medios adecuados para el cultivo de células eucariotas incluyen medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640), Medio Mínimo Esencial (MEM) y/o medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), pudiendo todos suplementarse con suero y/o factores de crecimiento cuando sea necesario para la línea celular en particular que se cultive. Un medio adecuado para cultivos de insectos es el medio de Grace suplementado con Yeastolate, hidrolizado de lactoalbúmina y/o suero fetal de ternero, cuando sea necesario.

Típicamente, se añade un antibiótico u otro compuesto útil para el cultivo selectivo de células transfectadas o transformadas como suplemento en los medios. El compuesto a usar estará determinado por el elemento marcador de selección presente en el plásmido con el que se transformó la célula hospedadora. Por ejemplo, cuando el elemento marcador de selección es la resistencia a kanamicina, el compuesto que se añade al medio de cultivo será kanamicina. Otros compuestos para el cultivo selectivo incluyen ampicilina, tetraciclina y neomicina.

La cantidad de un polipéptido TSLPR producida por una célula hospedadora puede evaluarse usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, sin limitación, análisis por transferencia de Western, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, electroforesis en gel no desnaturizante, separación por

cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), inmunoprecipitación y/o ensayos de actividad tales como ensayos de unión al ADN mediante cambios en la movilidad electroforética.

Si un polipéptido TSLPR se ha diseñado para secretarse a partir de las células hospedadoras, la mayoría del polipéptido se encontrará en el medio de cultivo celular. Sin embargo, si el polipéptido TSLPR no se secreta a partir de las células hospedadoras, estará presente en el citoplasma y/o el núcleo (para células hospedadoras eucariotas) o en el citosol (para células hospedadoras bacterianas gram-negativas).

Para un polipéptido TSLPR localizado en el citoplasma y/o núcleo de la célula hospedadora (para células hospedadoras eucariotas) o en el citosol (para células hospedadoras bacterianas), el material intracelular (incluyendo cuerpos de inclusión o bacterias gram-negativas) puede extraerse de la célula hospedadora usando cualquier técnica convencional conocida por el especialista. Por ejemplo, las células hospedadoras pueden lisarse para liberar el contenido del periplasma o citoplasma mediante prensa francesa, homogeneización y/o sonicación seguida de centrifugación.

Si un polipéptido TSLPR ha formado cuerpos de inclusión en el citosol, los cuerpos de inclusión pueden unirse con frecuencia a la membrana celular interna y/o externa y, de este modo, se encontrará principalmente en el material del sedimento después de la centrifugación. Después, el material del sedimento puede tratarse a pH extremos o con un agente caotrópico, tal como un detergente, guanidina, derivados de guanidina, urea o derivados de urea en presencia de un agente reductor tal como ditiotreitól a pH alcalino o tris carboxietil fosfina a pH ácido para liberar, romper y solubilizar los cuerpos de inclusión. Después, el polipéptido TSLPR solubilizado puede analizarse usando electroforesis en gel, inmunoprecipitación o similares. Si se desea aislar el polipéptido TSLPR el aislamiento puede llevarse a cabo usando métodos convencionales como los que se describen en este documento y en Marston *et al.*, 1990, *Meth. Enz.*, 182: 264-75.

En algunos casos, un polipéptido TSLPR puede no ser biológicamente activo después del aislamiento. Pueden usarse diversos métodos para "volver a plegar" o convertir el polipéptido en su estructura terciaria y generar puentes disulfuro para restaurar su actividad biológica. Dichos métodos incluyen la exposición del polipéptido solubilizado a un pH habitualmente por encima de 7 y en presencia de una concentración en particular de un caótropro. La selección del caótropro es muy similar a las selecciones que se usan para la solubilización de cuerpos de inclusión pero, habitualmente, el caótropro se usa a una concentración menor y no es necesariamente el mismo que los caótropros que se usan para la solubilización. En la mayoría de los casos, la solución de replegamiento/oxidación también contendrá un agente reductor o el agente reductor más su forma oxidada en una proporción específica para generar un potencial redox en particular que permita que se produzca una redistribución de disulfuros en la formación de los puentes cisteína de la proteína. Algunos de los pares redox comúnmente usados incluyen cisteína/cistamina, glutatión (GSH)/ditiobis GSH, cloruro de cobre, ditiotreitól (DTT)/ditiano DTT y 2-2-mercaptoetanol (bME)/ditio-b(ME). En muchos casos, puede usarse o puede ser necesario un codisolvente para aumentar la eficacia del replegamiento y los reactivos más comunes que se usan para este fin incluyen glicerol, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, arginina y similares.

Si no se forman cuerpos de inclusión en un grado significativo tras la expresión de un polipéptido TSLPR, entonces el polipéptido se encontrará principalmente en el sobrenadante después de la centrifugación del homogeneizado celular. El polipéptido puede aislarse adicionalmente del sobrenadante usando métodos tales como los que se describen en este documento.

La purificación de un polipéptido TSLPR a partir de una solución puede llevarse a cabo usando una diversidad de técnicas. Si el polipéptido se ha sintetizado de tal modo que contiene un marcador tal como hexahistidina (polipéptido TSLPR/hexaHis) u otro péptido pequeño tal como FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) o *myc* (Invitrogen, Carlsbad, CA) en su extremo carboxilo-terminal o amino-terminal, puede purificarse en un proceso de una sola etapa haciendo pasar la solución a través de una columna de afinidad en la que la matriz de la columna tenga una alta afinidad por el marcador.

Por ejemplo, la polihistidina se une con gran afinidad y especificidad al níquel. Por lo tanto, puede usarse una columna de afinidad de níquel (tal como las columnas de níquel de Qiagen®) para la purificación del polipéptido TSLPR/poliHis. Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* § 10.11.8 (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. y Wiley and Sons 1993).

Además, los polipéptidos TSLPR pueden purificarse mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que sea capaz de reconocer y unirse específicamente a un polipéptido TSLPR.

Otros procedimientos adecuados para la purificación incluyen, pero sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmutafinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de tamiz molecular, HPLC, electroforesis (incluyendo electroforesis en gel nativo) seguida de elución del gel y concentración isoeléctrica preparativa (maquina/técnica "Isoprime", Hoefer Scientific, San Francisco, CA). En algunos casos, pueden combinarse dos o más técnicas de purificación para conseguir una pureza aumentada.

También pueden prepararse polipéptidos TSLPR por métodos de síntesis química (tales como la síntesis de péptidos en fase sólida) usando técnicas conocidas en la técnica tales como las que se describen en Merrifield *et al.*, 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149; Houghten *et al.*, 1985, *Proc Natl Acad Sci. USA* 82: 5132; y Stewart y Young, *Solid Phase Peptides Synthesis* (Pierce Chemical Co. 1984). Dichos polipéptidos pueden sintetizarse con o sin una metionina en el extremo amino-terminal. Los polipéptidos TSLPR sintetizados químicamente pueden oxidarse usando métodos que se describen en esta bibliografía para formar puentes disulfuro. Se espera que los polipéptidos TSLPR sintetizados químicamente tengan una actividad biológica comparable a la de los polipéptidos TSLPR correspondientes producidos de forma recombinante o purificados a partir de fuentes naturales y que, por lo tanto, puedan usarse indistintamente con un polipéptido TSLPR recombinante o natural.

Otro medio de obtener un polipéptido TSLPR es mediante purificación a partir de muestras biológicas tales como tejidos y/o fluidos fuente en los que el polipéptido TSLPR se encuentra naturalmente. Dicha purificación puede realizarse usando métodos para purificación de proteínas que se describen en este documento. La presencia del polipéptido TSLPR durante la purificación puede controlarse, por ejemplo, usando un anticuerpo preparado contra polipéptido TSLPR producido de forma recombinante o fragmentos peptídicos del mismo.

Se conocen en la técnica varios métodos adicionales para producir ácidos nucleicos y polipéptidos y los métodos pueden usarse para producir polipéptidos que tengan especificidad por un polipéptido TSLPR. Véase, por ejemplo, Roberts *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 12297-303, que describe la producción de proteínas de fusión entre un ARNm y su péptido codificado. Véase también, Roberts, 1999, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3: 268-73. Además, la Patente de Estados Unidos N° 5.824.469 describe métodos para obtener oligonucleótidos capaces de realizar una función biológica específica. El procedimiento implica la generación de un conjunto heterogéneo de oligonucleótidos, teniendo cada uno una secuencia 5' aleatorizada, una secuencia central preseleccionada y una secuencia 3' aleatorizada. El conjunto heterogéneo resultante se introduce en una población de células que no presenten la función biológica deseada. Después, se exploran subpoblaciones de las células para determinar las que presentan una función biológica predeterminada. A partir de esa subpoblación, se aíslan los oligonucleótidos capaces de realizar la función biológica deseada.

Las Patentes de Estados Unidos N° 5.763.192; 5.814.476; 5.723.323; y 5.817.483 describen procesos para producir péptidos o polipéptidos. Esto se realiza mediante la producción de genes estocásticos o fragmentos de los mismos y, después, la introducción de estos genes en células hospedadoras que producen una o más proteínas codificadas por los genes estocásticos. Después, las células hospedadoras se exploran para identificar los clones que producen los péptidos o polipéptidos que tienen la actividad deseada.

Otro método para producir péptidos o polipéptidos se describe en el documento PCT/US98/20094 (WO99/15650) presentado por Athersys, Inc. Conocido como "Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery" (RAGE-GD), el proceso implica la activación de la expresión del gen endógeno o la sobreexpresión de un gen mediante métodos de recombinación *in situ*. Por ejemplo, se activa o aumenta la expresión de un gen endógeno mediante la integración de una secuencia reguladora en la célula diana que es capaz de activar la expresión del gen por recombinación no homóloga o ilegítima. El ADN diana se somete primero a radiación y se inserta un promotor genético. Finalmente, el promotor localiza una interrupción delante de un gen, iniciando la transcripción del gen. Esto da como resultado la expresión del péptido o polipéptido deseado.

Se entenderá que también pueden usarse estos métodos para generar genotecas completas de expresión de polipéptidos TSLPR que puedan usarse posteriormente para la exploración fenotípica de alto rendimiento y una diversidad de ensayos, tales como ensayos bioquímicos, ensayos celulares y ensayos de organismos completos (por ejemplo, plantas, ratones, etc.).

### Síntesis

Los especialistas en la técnica entenderán que las moléculas de ácido nucleico y polipéptidos descritas en este documento pueden producirse por medios recombinantes y otros medios.

### Agentes de unión selectiva

El término "agente de unión selectiva" se refiere a una molécula que tiene especificidad por uno o más polipéptidos TSLPR. Los agentes de unión selectiva adecuados incluyen, pero sin limitación, anticuerpos y derivados de los mismos, polipéptidos y moléculas pequeñas. Pueden prepararse agentes de unión selectiva adecuados usando métodos conocidos en la técnica. Un agente de unión selectiva a polipéptido TSLPR ejemplar de la presente invención es capaz de unirse a cierta porción del polipéptido TSLPR, inhibiendo de este modo la unión del polipéptido con un receptor de polipéptido TSLPR.

Dentro del alcance de la presente invención se incluyen agentes de unión selectiva tales como anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen a polipéptidos TSLPR. Los anticuerpos pueden ser policlonales, incluyendo policlonales monoespecíficos; monoclonales (MAb); recombinantes, quiméricos, humanizados, tales como injertados en una región determinante de complementariedad (CDR); humanos; de cadena sencilla; y/o biespecíficos, así como

fragmentos; variantes; o derivados de los mismos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen las porciones del anticuerpo que se unen a un epítipo en el polipéptido TSLPR. Los ejemplos de dichos fragmentos incluyen fragmentos Fab y F(ab') generados por escisión enzimática de anticuerpos de longitud completa. Otros fragmentos de unión incluyen los que se generan por técnicas de ADN recombinante, tales como la expresión de plásmidos recombinantes que contienen secuencias de ácidos nucleicos que codifican regiones variables de anticuerpos.

Los anticuerpos policlonales dirigidos contra un polipéptido TSLPR se producen generalmente en animales (por ejemplo, conejos o ratones) por medio de múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales de polipéptido TSLPR y un adyuvante. Puede ser útil conjugar un polipéptido TSLPR con una proteína de soporte que sea inmunogénica en la especie a inmunizar, tal como la hemocianina de lapa californiana, albúmina del suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de la tripsina de la soja. Además, se usan agentes agregantes tales como alumbre para potenciar la respuesta inmune. Después de la inmunización, se extrae sangre de los animales y el suero se analiza para determinar el título de anticuerpos anti-polipéptido TSLPR.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra polipéptidos TSLPR se producen usando cualquier método que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares en cultivo continuo. Los ejemplos de métodos adecuados para preparar anticuerpos monoclonales incluyen los métodos del hibridoma de Kohler *et al.*, 1975, *Nature* 256: 495-97 y el método del hibridoma de células B humanas (Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133: 3001; Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987). También se proporcionan por la invención líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales reactivos con polipéptidos TSLPR.

Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden modificarse para su uso como agentes terapéuticos. Una realización es un anticuerpo "quimérico" en el que una porción de la cadena pesada (H) y/o ligera (L) es idéntica a, u homóloga a, una secuencia correspondiente en anticuerpos obtenidos de una especie en particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que las restantes cadenas son idénticas a, u homólogas a, una secuencia correspondiente en anticuerpos obtenidos de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos. También se incluyen fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada. Véanse, la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 6851-55.

En otra realización, un anticuerpo monoclonal de la invención es un anticuerpo "humanizado". Se conocen bien en la técnica métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Véanse las Patentes de Estados Unidos N° 5.585.089 y 5.693.762. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene introducidos en él uno o más restos aminoácidos de una procedencia no humana. La humanización puede realizarse, por ejemplo, usando métodos descritos en la técnica (Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321: 522-25; Riechmann *et al.*, 1998, *Nature* 332: 323-27; Verhoeven *et al.*, 1988; *Science* 239: 1534-36), mediante la sustitución con al menos una porción de una región determinante de complementariedad (CDR) de un roedor de las regiones correspondientes de un anticuerpo humano.

También se incluyen en la invención anticuerpos humanos que se unen a polipéptidos TSLPR. Usando animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de una producción de inmunoglobulinas endógena, dichos anticuerpos se producen mediante la inmunización con un antígeno polipeptídico TSLPR (es decir, que tiene al menos 6 aminoácidos contiguos), opcionalmente conjugado con un vehículo. Véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 2551-55; Jakobovits *et al.*, 1993, *Nature* 326: 255-58; Bruggermann *et al.*, 1993, *Year in Immuno*, 7: 33. En un método, dichos animales transgénicos se producen mediante la incapacitación de los loci endógenos que codifican las cadenas de inmunoglobulinas pesadas y ligeras en los mismos y la inserción de loci que codifican proteínas de las cadenas pesada y ligera humanas en el genoma de los mismos. Después, los animales parcialmente modificados, es decir, los que tienen menos que la dotación completa de modificaciones, se retrocruzan hasta obtener un animal que tiene todas las modificaciones del sistema inmunitario deseadas. Cuando se administra un inmunógeno, estos animales transgénicos producen anticuerpos con secuencias de aminoácidos humanas (en lugar de, por ejemplo, murinas) incluyendo regiones variables que son inmunoespecíficas para estos antígenos. Véanse las Solicitudes PCT N° PCT/US96/05928 y PCT/US93/06926. Se describen métodos adicionales en la Patente de Estados Unidos N° 5.545.807, en las Solicitudes PCT N° PCT/US91/245 y PCT/GB89/01207 y en las Patentes Europeas N° 546073B1 y 546073A1. También pueden producirse anticuerpos humanos mediante la expresión de ADN recombinante en células hospedadoras o mediante la expresión en células de hibridoma como se describe en este documento.

En una realización alternativa, también pueden producirse anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 227: 381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581). Estos procesos mimetizan la selección inmunológica mediante la presentación de repertorios de anticuerpos en la superficie de bacteriófagos filamentosos y la posterior selección de fagos por su unión a un antígeno de elección. Una de dichas técnicas se describe en la Solicitud PCT N°. PCT/US98/17364, que describe el aislamiento de anticuerpos agonistas funcionales y de alta afinidad por receptores de MPL y msk usando dicho planteamiento.

Los anticuerpos quiméricos, injertados en CDR y humanizados se producen típicamente por métodos recombinantes. Se introducen ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos en células hospedadoras y se

expresan usando materiales y procedimientos que se describen en este documento. En una realización preferida, los anticuerpos se producen en células hospedadoras de mamíferos, tales como células CHO. Pueden producirse anticuerpos monoclonales (por ejemplo, humanos) mediante la expresión de ADN recombinante en células hospedadoras o mediante la expresión en células de hibridoma, como se describe en este documento.

5 Los anticuerpos anti-TSLPR de la invención pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación (Sola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* 147-158 (RCR Press, Inc., 1987)) para la detección y cuantificación de polipéptidos TSLPR. Los anticuerpos se unirán a polipéptidos TSLPR con una afinidad que sea apropiada para el método de ensayo que se emplea.

15 Para aplicaciones de diagnóstico, en ciertas realizaciones, pueden marcarse anticuerpos anti-TSLPR con un resto detectable. El resto detectable puede ser uno cualquiera que sea capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  o  $^{67}\text{Ga}$ ; un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; o una enzima, tal como fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa o peroxidasa de rábano rústico (Bayer, *et al.*, 1990, *Meth. Enz.* 184: 138-63).

20 Los ensayos de unión competitiva dependen de la capacidad de un patrón marcado (por ejemplo, un polipéptido TSLPR o una porción inmunológicamente reactiva del mismo) para competir con el analito de la muestra de ensayo (un polipéptido TSLPR) por la unión con una cantidad limitada de anticuerpos anti-TSLPR. La cantidad de un polipéptido TSLPR en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos típicamente se insolubilizan antes o después de la competición, de tal modo que el patrón y el analito que están unidos a los anticuerpos pueden separarse convenientemente del patrón y del analito que permanecen no unidos.

30 Típicamente los ensayos de tipo sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una porción inmunogénica diferente, o epítipo, de la proteína a detectar y/o cuantificar. En un ensayo de tipo sándwich, el analito de la muestra de ensayo se une, típicamente, por un primer anticuerpo que está inmovilizado sobre un soporte sólido y, posteriormente, un segundo anticuerpo se une al analito, formando de este modo un complejo tripartito insoluble. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.376.110. El segundo anticuerpo puede estar de por sí marcado con un resto detectable (ensayos de tipo sándwich directos) o puede medirse usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que esté marcado con un resto detectable (ensayos de tipo sándwich indirectos). Por ejemplo, un tipo de ensayo de sándwich es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), caso en el que el resto detectable es una enzima.

40 Los agentes de unión selectiva, incluyendo anticuerpos anti-TSLPR, también son útiles para la formación de imágenes *in vivo*. Un anticuerpo marcado con un resto detectable puede administrarse a un animal, preferiblemente en el torrente sanguíneo y analizarse la presencia y la localización del anticuerpo marcado en el hospedador. El anticuerpo puede marcarse con cualquier resto que sea detectable en un animal, ya sea por resonancia magnética nuclear, radiología u otro medio de detección conocido en la técnica.

45 Los agentes de unión selectiva de la invención, incluyendo los anticuerpos, pueden usarse como agentes terapéuticos. Estos agentes terapéuticos son generalmente agonistas o antagonistas por el hecho de que potencian o reducen, respectivamente, al menos una de las actividades biológicas de un polipéptido TSLPR. En una realización, los anticuerpos antagonistas de la invención son anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido TSLPR y que son capaces de inhibir o eliminar la actividad funcional de un polipéptido TSLPR *in vivo* o *in vitro*. En realizaciones preferidas, el agente de unión selectiva, por ejemplo, un anticuerpo antagonista, inhibirá la actividad funcional de un polipéptido TSLPR en al menos aproximadamente el 50% y, preferiblemente, en al menos aproximadamente el 80%. En otra realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-polipéptido TSLPR que sea capaz de interactuar con un compañero de unión de polipéptido TSLPR (un ligando o receptor), inhibiendo o eliminado de este modo la actividad del polipéptido TSLPR *in vitro* o *in vivo*. Se identifican agentes de unión selectiva, incluyendo anticuerpos anti-polipéptido TSLPR agonistas y antagonistas, mediante ensayos de selección que se conocen bien en la técnica.

55 También se describe en este documento un kit que comprende agentes de unión selectiva a TSLPR (tales como anticuerpos) y otros reactivos útiles para detectar niveles de polipéptidos TSLPR en muestras biológicas. Dichos reactivos pueden incluir un marcador detectable, suero bloqueante, muestras de control positivo y negativo y reactivos de detección.

## 60 Micromatrices

65 Se entenderá que puede utilizarse la tecnología de micromatrices de ADN de acuerdo con la presente invención. Las micromatrices de ADN son matrices en miniatura de alta densidad de ácidos nucleicos colocados sobre un soporte sólido tal como vidrio. Cada celda o elemento dentro de la matriz contiene numerosas copias de una única especie de ácido nucleico que actúa como diana para la hibridación con una secuencia de ácido nucleico complementaria

(por ejemplo, ARNm). En la generación de perfiles de expresión mediante el uso de la tecnología de micromatrices de ADN, se extrae primero el ARNm de una muestra celular o tisular y después se convierte enzimáticamente en ADNc marcado fluorescentemente. Este material se hibrida con la micromatriz y el ADNc no unido se retira mediante lavado. Después, la expresión de genes específicos representados en la matriz se visualiza mediante la cuantificación de la cantidad de ADNc marcado que está específicamente unido a cada molécula de ácido nucleico diana. De esta forma, puede cuantificarse la expresión de miles de genes de una forma paralela, de alto rendimiento, a partir de una única muestra de material biológico.

Esta generación de perfiles de expresión de alto rendimiento tiene una amplia variedad de aplicaciones con respecto a las moléculas de TSLPR de la invención, incluyendo, pero sin limitación: la identificación y validación de genes relacionados con enfermedades de TSLPR como dianas para la terapéutica; la toxicología molecular de moléculas de TSLPR relacionadas e inhibidores de las mismas; la estratificación de poblaciones y la generación de marcadores sustitutos para ensayos clínicos; y la potenciación del descubrimiento de pequeñas moléculas de fármacos de polipéptidos TSLPR relacionados mediante la contribución a la identificación de compuestos selectivos en exploraciones de alto rendimiento.

#### Derivados químicos

Pueden prepararse derivados de polipéptidos TSLPR modificados químicamente por un especialista en la técnica, dadas las descripciones que se explican en este documento. Los derivados de polipéptidos TSLPR se modifican de un modo que es diferente, por el tipo o la localización de las moléculas naturalmente unidas al polipéptido. Los derivados pueden incluir moléculas formadas por la delección de uno o más grupos químicos naturalmente unidos. El polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 u otro polipéptido TSLPR puede modificarse mediante la unión covalente de uno o más polímeros. Por ejemplo, típicamente, el polímero seleccionado es soluble en agua, de tal modo que la proteína con la que se une no precipite en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. Se incluye dentro del alcance de los polímeros adecuados una mezcla de polímeros. Preferiblemente, para uso terapéutico de la preparación de producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable.

Cada uno de los polímeros puede ser de cualquier peso molecular y pueden estar ramificados o no ramificados. Cada uno de los polímeros tiene, típicamente, un peso molecular medio de entre aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa (el término "aproximadamente" indica que en preparaciones de un polímero soluble en agua, algunas moléculas pesarán más y algunas menos que el peso molecular que se indica). El peso molecular medio de cada polímero está preferiblemente entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, más preferiblemente entre aproximadamente 12 kDa y aproximadamente 40 kDa y más preferiblemente entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 35 kDa.

Los polímeros solubles en agua adecuados o mezclas de los mismos incluyen, pero sin limitación, hidratos de carbono ligados a N o ligados a O, azúcares, fosfatos, polietilenglicol (PEG) (incluyendo las formas de PEG que se han usado para derivatizar proteínas, incluyendo mono-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-polietilenglicol, alcoxi-polietilenglicol o ariloxi-polietilenglicol), monometoxi-polietilenglicol, dextrano (tal como dextrano de bajo peso molecular de, por ejemplo, aproximadamente 6 kDa), celulosa u otros polímeros basados en hidratos de carbono, poli-(N-vinilpirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol) y alcohol polivinílico. También se describen en este documento moléculas reticulantes bifuncionales que pueden usarse para preparar multímeros de polipéptidos TSLPR unidos covalentemente.

En general, la derivatización química puede realizarse en cualquier condición adecuada que se use para hacer reaccionar una proteína con una molécula de polímero activado. Los métodos para preparar derivados químicos de polipéptidos comprenderán generalmente las etapas de: (a) hacer reaccionar el polipéptido con la molécula de polímero activada (tal como un derivado éster o aldehído reactivo de la molécula de polímero) en condiciones en las que el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 u otro polipéptido TSLPR se une con una o más moléculas de polímero y (b) obtener los productos de reacción. Las condiciones de reacción óptimas se determinarán en base a parámetros conocidos y al resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor la proporción de moléculas de polímero con respecto a la proteína, mayor el porcentaje de molécula de polímero unida. En una realización, el derivado de polipéptido TSLPR puede tener un único resto de molécula de polímero en el extremo amino-terminal. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.234.784.

La pegilación de un polipéptido puede realizarse específicamente usando cualquiera de las reacciones de pegilación conocidas en la técnica. Dichas reacciones se describen, por ejemplo, en la siguiente bibliografía: Francis *et al.*, 1992, *Focus on Growth Factors* 3: 4-10; Patentes Europeas N° 0154316 y 0401384; y Patente de Estados Unidos N° 4.179.337. Por ejemplo, la pegilación puede realizarse mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo), como se describe en este documento. Para las reacciones de acilación, un polímero seleccionado debería tener un único grupo éster reactivo. Para la alquilación reductora, un polímero seleccionado debería tener un único grupo aldehído

reactivo. Un aldehído reactivo es, por ejemplo, propionaldehído de polietilenglicol, que es estable en agua, o derivados mono C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alcoxi o ariloxi del mismo (véase la Patente de Estados Unidos N° 5.252.714).

5 Los polipéptidos TSLPR pueden acoplarse químicamente con biotina. Después, se deja que las moléculas de biotina/polipéptido TSLPR se unan a avidina, dando como resultado moléculas tetravalentes de avidina/biotina/polipéptido TSLPR. Los polipéptidos TSLPR también pueden acoplarse covalentemente con dinitrofenol (DNP) o trinitrofenol (TNP) y los conjugados resultantes precipitarse con anti-DNP o anti TNP-IgM para formar conjugados decaméricos con una valencia de 10.

10 Generalmente, las afecciones que pueden aliviarse o modularse mediante la administración de los presentes derivados de polipéptidos TSLPR incluyen las que se han descrito en este documento para polipéptidos TSLPR. Sin embargo, los derivados de polipéptidos TSLPR que se describen en este documento pueden tener actividades adicionales, una actividad biológica potenciada o reducida u otras características, tales como una vida media aumentada o disminuida en comparación con las moléculas no derivatizadas.

#### 15 Animales no humanos generados por ingeniería genética

Se incluyen adicionalmente dentro del alcance de la presente invención animales no humanos, tales como ratones, ratas u otros roedores; conejos, cabras, ovejas u otros animales de granja, en los que se hayan interrumpido los genes que codifican el polipéptido TSLPR nativo (es decir, "knocked out") de tal modo que el nivel de expresión del polipéptido TSLPR se disminuya significativamente o se suprima completamente. Dichos animales pueden prepararse usando técnicas y métodos como los que se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.557.032.

25 Se describen además en este documento animales no humanos tales como ratones, ratas u otros roedores; conejos, cabras, ovejas u otros animales de granja, en los que la forma nativa de un gen de TSLPR para ese animal o un gen de TSLPR heterólogo se sobreexpresa por el animal, generando de este modo un animal "transgénico". Dichos animales transgénicos pueden prepararse usando métodos bien conocidos, tales como los que se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.489.743 y en la Publicación PCT N° WO94/28122.

30 Se describen además en este documento animales no humanos en los que el promotor para uno o más de los polipéptidos TSLPR de la presente invención se activa o se inactiva (por ejemplo, mediante el uso de métodos de recombinación homóloga) para alterar el nivel de expresión de uno o más de los polipéptidos TSLPR nativos.

35 Estos animales no humanos pueden usarse para exploraciones de candidatos a fármacos. En dichas exploraciones, puede medirse el impacto de un candidato a fármaco en el animal. Por ejemplo, los candidatos a fármaco pueden disminuir o aumentar la expresión del gen de TSLPR. En ciertas realizaciones, la cantidad de polipéptido TSLPR que se produce puede medirse después de la exposición del animal al candidato a fármaco. Además, se puede detectar el impacto real del candidato a fármaco en el animal. Por ejemplo, la sobreexpresión de un gen en particular puede dar como resultado, o puede asociarse con, una enfermedad o afección patológica. En dichos casos, se puede ensayar la capacidad de un candidato a fármaco para disminuir la expresión del gen o su capacidad para prevenir o inhibir una afección patológica. En otros ejemplos, la producción de un producto metabólico en particular, tal como un fragmento de un polipéptido, puede dar como resultado, o asociarse con, una enfermedad o afección patológica. En dichos casos, se puede ensayar la capacidad de un candidato a fármaco para disminuir la producción de dicho producto metabólico o su capacidad para prevenir o inhibir una afección patológica.

#### 45 Evaluación de otros moduladores de la actividad del polipéptido TSLPR

En algunas situaciones, puede ser deseable identificar moléculas que sean moduladoras, es decir, agonistas o antagonistas de la actividad del polipéptido TSLPR. Pueden identificarse moléculas naturales o sintéticas que modulan al polipéptido TSLPR usando uno o más ensayos de exploración, tales como los que se describen en este documento. Dichas moléculas pueden administrarse de una forma *ex vivo* o de una forma *in vivo*, mediante inyección o mediante administración por vía oral, un dispositivo de implante o similares.

55 La expresión "molécula de ensayo" se refiere a una molécula que se está evaluando para determinar su capacidad para modular (es decir, aumentar o disminuir) la actividad de un polipéptido TSLPR. Más comúnmente, una molécula de ensayo interaccionará directamente con un polipéptido TSLPR. Sin embargo, también se contempla que una molécula de ensayo también puede modular la actividad del polipéptido TSLPR indirectamente, tal como afectando a la expresión del gen de TSLPR o mediante la unión a un compañero de unión del polipéptido TSLPR (por ejemplo, un receptor o ligando). En una realización, una molécula de ensayo se unirá a un polipéptido TSLPR con una afinidad constante de al menos aproximadamente 10<sup>-6</sup> M, preferiblemente de aproximadamente 10<sup>-8</sup>M, más preferiblemente de aproximadamente 10<sup>-9</sup>M y aún más preferiblemente de aproximadamente 10<sup>-10</sup> M.

65 Se incluyen en la presente invención métodos para identificar compuestos que interaccionen con polipéptidos TSLPR. En ciertas realizaciones, un polipéptido TSLPR se incubaba con una molécula de ensayo en condiciones que permitan la interacción de la molécula de ensayo con un polipéptido TSLPR y se mide el grado de interacción. La molécula de ensayo puede explorarse en una forma sustancialmente purificada o en una mezcla bruta.

En ciertas realizaciones, un agonista o antagonista del polipéptido TSLPR puede ser una proteína, péptido, hidrato de carbono, lípido o molécula de pequeño peso molecular que interactúe con el polipéptido TSLPR para regular su actividad. Las moléculas que regulan la expresión del polipéptido TSLPR incluyen ácidos nucleicos que son complementarios a los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido TSLPR o que son complementarios a secuencias de ácidos nucleicos que dirigen o controlan la expresión del polipéptido TSLPR y que actúan como reguladores antisentido de la expresión.

Una vez que se ha identificado que una molécula de ensayo interactúa con un polipéptido TSLPR, la molécula puede evaluarse adicionalmente para determinar su capacidad para aumentar o disminuir la actividad del polipéptido TSLPR. La medición de la interacción de una molécula de ensayo con un polipéptido TSLPR puede realizarse en varios formatos, incluyendo ensayos de unión basados en células, ensayos de unión a membrana, ensayos en fase de solución e inmunoensayos. En general, una molécula de ensayo se incuba con un polipéptido TSLPR durante un periodo específico de tiempo y se determina la actividad del polipéptido TSLPR mediante uno o más ensayos para medir la actividad biológica.

La interacción de moléculas de ensayo con polipéptidos TSLPR también puede evaluarse directamente usando anticuerpos policlonales o monoclonales en un inmunoensayo. Como alternativa, pueden usarse formas modificadas de polipéptidos TSLPR que contienen marcadores de epítopos, como se han descrito en este documento, en solución y en inmunoensayos.

En el caso de que los polipéptidos TSLPR presenten actividad biológica mediante una interacción con un compañero de unión (por ejemplo, un receptor o un ligando) pueden usarse una diversidad de ensayos *in vitro* para medir la unión de un polipéptido TSLPR con el compañero de unión correspondiente (tal como un agente de unión selectiva, receptor o ligando). Estos ensayos pueden usarse para explorar moléculas de ensayo para determinar su capacidad para aumentar o disminuir la velocidad y/o el grado de unión de un polipéptido TSLPR con su compañero de unión. En un ensayo, un polipéptido TSLPR se inmoviliza en los pocillos de una placa de microtitulación. Después, puede añadirse un compañero de unión del polipéptido TSLPR radiomarcado (por ejemplo, un compañero de unión del polipéptido TSLPR yodado) y una molécula de ensayo, ya sea primero uno y luego otro (en cualquier orden) o simultáneamente en los pocillos. Después de la incubación, los pocillos pueden lavarse y contarse para determinar la radiactividad usando un contador de centelleo para determinar el grado en el que el compañero de unión está unido con el polipéptido TSLPR. Típicamente, una molécula se ensayará contra un intervalo de concentraciones y pueden usarse una serie de pocillos de control, que carecen de uno o más elementos de los ensayos de evaluación, para dar precisión a la evaluación de los resultados. Una alternativa a este método implica revertir las "posiciones" de las proteínas, es decir, inmovilizar el compañero de unión del polipéptido TSLPR en los pocillos de la placa de microtitulación, incubar con la molécula de ensayo y con el polipéptido TSLPR radiomarcado y determinar el grado de unión del polipéptido TSLPR. Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 18 (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. y Wiley and Sons 1995).

Como una alternativa al radiomarcaje, un polipéptido TSLPR o su compañero de unión pueden conjugarse con biotina y, después, la presencia de proteína biotinilada puede detectarse usando estreptavidina ligada a una enzima, tal como peroxidasa de rábano rusticano (HRP) o fosfatasa alcalina (AP), que pueden detectarse de forma colorimétrica, o mediante marcadores fluorescentes de estreptavidina. Un anticuerpo dirigido contra un polipéptido TSLPR o contra un compañero de unión del polipéptido TSLPR y que esté conjugado con biotina también puede usarse para los fines de la detección, después de la incubación del complejo con estreptavidina ligada a enzima ligada a AP o HRP.

Un polipéptido TSLPR o un compañero de unión de un polipéptido TSLPR también pueden inmovilizarse por unión con perlas de agarosa, perlas acrílicas u otros tipos de dichos sustratos inertes en fase sólida. El complejo sustrato-proteína puede colocarse en una solución que contenga la proteína complementaria y el compuesto de ensayo. Después de la incubación, las perlas pueden precipitarse mediante centrifugación y la cantidad de unión entre un polipéptido TSLPR y su compañero de unión puede evaluarse usando los métodos que se describen en este documento. Como alternativa, el complejo sustrato-proteína puede inmovilizarse en una columna con la molécula de ensayo y hacerse pasar una proteína complementaria a través de la columna. La formación de un complejo entre un polipéptido TSLPR y su compañero de unión puede evaluarse después usando cualquiera de las técnicas que se describen en este documento (por ejemplo, radiomarcaje o unión a anticuerpos).

Otro ensayo *in vitro* que es útil para la identificación de una molécula de ensayo que aumente o disminuya la formación de un complejo entre una proteína de unión de polipéptido TSLPR y un compañero de unión de polipéptido TSLPR es un sistema detector de resonancia de plasmón superficial, tal como el sistema de ensayo BIAcore (Pharmacia, Piscataway, NJ). El sistema BIAcore se utiliza como especifica el fabricante. Este ensayo implica esencialmente la unión covalente de un polipéptido TSLPR o de un compañero de unión de un polipéptido TSLPR con una microplaca sensora revestida con dextrano, que se localiza en un detector. El compuesto de ensayo y la otra proteína complementaria pueden inyectarse después, simultáneamente o secuencialmente, en la cámara que contiene la microplaca sensora. La cantidad de proteína complementaria que se une puede evaluarse en base a la variación de la masa molecular que está físicamente asociada con el lado revestido con dextrano de la microplaca sensora, midiéndose la variación de la masa molecular mediante el sistema detector.

En algunos casos, puede ser deseable evaluar dos o más compuestos de ensayo juntos para determinar su capacidad para aumentar o disminuir la formación de un complejo entre un polipéptido TSLPR y un compañero de unión de polipéptido TSLPR. En estos casos los ensayos que se exponen en este documento pueden modificarse fácilmente mediante la adición de dichos compuestos de ensayo adicionales simultáneamente con, o posteriormente a, el primer compuesto de ensayo. Las restantes etapas del ensayo son como se han expuesto en este documento.

Pueden usarse ventajosamente ensayos *in vitro* tales como los que se describen en este documento para explorar grandes cantidades de compuestos para determinar un efecto sobre la formación de un complejo entre un polipéptido TSLPR y un compañero de unión del polipéptido TSLPR. Los ensayos pueden automatizarse para explorar compuestos generados en bibliotecas de presentación en fagos, de péptidos sintéticos y de síntesis química.

Los compuestos que aumentan o disminuyen la formación de un complejo entre un polipéptido TSLPR y un compañero de unión de un polipéptido TSLPR también pueden explorarse en un cultivo celular, usando células y líneas celulares que expresen polipéptido TSLPR o compañero de unión del polipéptido TSLPR. Las células y líneas celulares pueden obtenerse a partir de cualquier mamífero, pero preferiblemente serán de origen humano u de otro primate, canino o de roedores. La unión de un polipéptido TSLPR con células que expresan compañero de unión del polipéptido TSLPR en la superficie se evalúa en presencia o ausencia de moléculas de ensayo y el grado de unión puede determinarse mediante, por ejemplo, citometría de flujo, usando un anticuerpo biotinilado contra un compañero de unión del polipéptido TSLPR. Ventajosamente, pueden usarse ensayos de cultivos celulares para evaluar adicionalmente compuestos que obtengan una puntuación positiva en los ensayos de unión a proteína que se describen en este documento.

También pueden usarse cultivos celulares para explorar el impacto de un candidato a fármaco. Por ejemplo, los candidatos a fármaco pueden disminuir o aumentar la expresión del gen de TSLPR. Por ejemplo, puede medirse la cantidad de polipéptido TSLPR o de un fragmento de polipéptido TSLPR que se produce después de la exposición del cultivo celular al candidato a fármaco. Se puede detectar el impacto real del candidato a fármaco sobre el cultivo celular. Por ejemplo, la sobreexpresión de un gen en particular puede tener un impacto particular sobre el cultivo celular. En dichos casos, se puede ensayar la capacidad de un candidato a fármaco para aumentar o disminuir la expresión del gen o su capacidad para prevenir o inhibir un impacto en particular sobre el cultivo celular. En otros ejemplos, la producción de un producto metabólico en particular, tal como un fragmento de un polipéptido, puede dar como resultado, o estar asociada a, una enfermedad o afección patológica. En dichos casos, se puede ensayar la capacidad de un candidato a fármaco para disminuir la producción de dicho producto metabólico en un cultivo celular.

#### Internalización de proteínas.

La secuencia de proteína *tat* (del VIH) puede usarse para internalizar proteínas en una célula. Véase, por ejemplo, Falwell *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 664-68. Por ejemplo, se ha descrito que una secuencia de 11 aminoácidos (Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEC ID N°: 13) de la proteína *tat* del VIH (denominado "dominio de transducción de proteínas" o TAT PDT) media la liberación a través de la membrana citoplasmática y de la membrana nuclear de una célula. Véanse Schwarze *et al.*, 1999, *Science* 285: 1569-72; y Nagahara *et al.*, 1998, *Nat. Med.* 4: 1449-52. En estos procedimientos, se preparan construcciones de FITC (G-G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R marcada con FITC; SEC ID N°: 14) que penetran en tejidos después de la administración por vía intraperitoneal y se detecta la unión de dichas construcciones con las células mediante análisis de selección de células activadas por fluorescencia (FACS). Las células tratadas con una proteína de fusión *tat*- $\beta$ -gal demostrarán actividad  $\beta$ -gal. Después de la inyección, la expresión de dicha construcción puede detectarse en varios tejidos, incluyendo hígado, riñón, pulmón, corazón y tejido cerebral. Se piensa que dichas construcciones sufren cierto grado de desplegamiento para entrar en la célula y así, después de su entrada en la célula pueden requerir un repliegamiento.

Se apreciará, por lo tanto, que la secuencia de la proteína *tat* puede usarse para internalizar un polipéptido deseado en una célula. Por ejemplo, usando la secuencia de proteína *tat*, puede administrarse intracelularmente un antagonista de TSLPR (tal como un agente de unión selectiva anti-TSLPR, una molécula pequeña, un receptor soluble o un oligonucleótido antisentido) para inhibir la actividad de una molécula de TSLPR. Como se usa en este documento, la expresión "molécula de TSLPR" se refiere tanto a moléculas de ácido nucleico de TSLPR como a polipéptidos TSLPR, como se han definido en este documento. Cuando se desee, la propia proteína TSLPR también puede administrarse internamente en una célula usando estos procedimientos. Véase también, Straus, 1999, *Science* 285: 1466-67.

#### Identificación del origen celular usando polipéptidos TSLPR

De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, puede ser útil ser capaz de determinar el origen de cierto tipo celular asociado con un polipéptido TSLPR. Por ejemplo, puede ser útil determinar el origen de una enfermedad o afección patológica como ayuda para la selección de una terapia apropiada. En ciertas realizaciones, pueden usarse ácidos nucleicos que codifican polipéptido TSLPR como una sonda para identificar células que se describen en este

documento mediante la exploración de ácidos nucleicos de las células con dicha sonda. En otras realizaciones, se pueden usar anticuerpos anti-polipéptido TSLPR para evaluar la presencia de polipéptido TSLPR en las células y, de este modo, determinar si dichas células son de los tipos que se describen en este documento.

##### 5 Composiciones de polipéptido TSLPR y administración

Se incluyen dentro del alcance de la presente invención composiciones terapéuticas. Dichas composiciones farmacéuticas de polipéptido TSLPR pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido TSLPR o de una molécula de ácido nucleico de TSLPR junto con un agente de formulación farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable seleccionado por ser adecuado con el modo de administración. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes de unión selectiva a polipéptido TSLPR junto con un agente de formulación farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable seleccionado por ser adecuado con el modo de administración.

15 Los materiales de formulación aceptables son preferiblemente no tóxicos para el destinatario a las dosificaciones y concentraciones que se emplean.

La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, pH, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, índice de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, pero sin limitación, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina), antimicrobianos, antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito sódico o hidrógenosulfito sódico), tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos, u otros ácidos orgánicos), agentes formadores de volumen (tales como manitol o glicina), agentes quelantes (tales como ácido tetraacético de etilendiamina (EDTA)), agentes formadores de complejos (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina), cargas, monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas), proteínas (tales como albúmina del suero, gelatina o inmunoglobulinas), colorantes, aromatizantes y agentes diluyentes, agentes emulsionantes, polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona), polipéptidos de bajo peso molecular, contraiones formadores de sales (tales como sodio), conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno), disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol), alcoholes de azúcares (tales como manitol o sorbitol), agentes de suspensión, tensioactivos o agentes humectantes (tales como plurónicos; PEG; ésteres de sorbitán; polisorbatos, tales como polisorbato 20 o polisorbato 80; tritón; trometamina, lecitina; colesterol o tiloxapal), agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol), agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos —preferiblemente cloruro de sodio o de potasio— o manitol sorbitol), vehículos de administración, diluyentes, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Véase, *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18ª Ed., A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990).

La composición farmacéutica óptima será determinada por un especialista dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración que se pretende, el formato de administración y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, anteriormente. Dichas composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, el índice de liberación *in vivo* y el índice de aclaramiento *in vivo* de la molécula de TSLPR.

El vehículo o excipiente principal en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o excipiente adecuado para inyección puede ser agua, solución salina fisiológica o líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente suplementado con otros materiales comunes en composiciones para la administración por vía parenteral. Son vehículos ejemplares adicionales solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina del suero. Otras composiciones farmacéuticas ejemplares comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5 o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que pueden incluir además sorbitol o un sustituto adecuado. En una realización de la presente invención, pueden prepararse composiciones de polipéptido TSLPR para su almacenamiento mediante la mezcla de la composición seleccionada, que tiene el grado de pureza deseado, con agentes de formulación opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, anteriormente) en forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, el producto de polipéptido TSLPR puede formularse como un liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas de polipéptido TSLPR pueden seleccionarse para la administración por vía parenteral. Como alternativa, las composiciones pueden seleccionarse para administrarse por inhalación o para administrarse a través del tracto digestivo, tal como por vía oral. La preparación de dichas composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro de la técnica especialista.

Los componentes de formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. Por ejemplo, se usan tampones para mantener la composición a un pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, típicamente, dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

65 Cuando se contempla la administración por vía parenteral, las composiciones terapéuticas para usar en esta invención pueden ser en forma de una solución acuosa, parenteralmente aceptable y sin pirógenos que comprende

la molécula de TSLPR deseada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección por vía parenteral es agua destilada estéril, en la que se formula una molécula de TSLPR como una solución isotónica estéril adecuadamente conservada. Otra preparación más puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que proporcionen la liberación controlada o sostenida del producto que después puede administrarse mediante una inyección de liberación prolongada. También puede usarse ácido hialurónico, y éste puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. Otros medios adecuados para la introducción de la molécula deseada incluyen dispositivos de administración de fármacos implantables.

En una realización, una composición farmacéutica puede formularse para administrarse por inhalación. Por ejemplo, el polipéptido TSLPR puede formularse como un polvo seco para inhalación. También pueden formularse soluciones para inhalación de moléculas de ácido nucleico o de polipéptido TSLPR con un propulsor para la administración en aerosol. En otra realización más, las soluciones pueden nebulizarse. La administración por vía pulmonar se describe adicionalmente en la Publicación PCT N° WO 94/20069, que describe la administración pulmonar de proteínas modificadas químicamente.

También se contempla que ciertas formulaciones pueden administrarse por vía oral. En una realización de la presente invención, los polipéptidos TSLPR que se administran de este modo pueden formularse con o sin los vehículos que se usan normalmente en la preparación de compuestos de formas de dosificación sólidas, tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, puede diseñarse una cápsula para liberar la porción activa de la formulación en el momento en el tracto gastrointestinal en el que se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción del polipéptido TSLPR. También pueden emplearse diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes disgregantes de comprimidos y aglutinantes.

Otra composición farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de polipéptidos TSLPR en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Mediante la disolución de comprimidos en agua estéril o en otro vehículo apropiado, pueden prepararse soluciones en forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato sódico o bicarbonato, lactosa o fosfato cálcico; o agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes, tales como estearato magnésico, ácido esteárico o talco.

Composiciones farmacéuticas de polipéptido TSLPR adicionales serán evidentes para los especialistas en la técnica, incluyendo formulaciones que implican polipéptidos TSLPR en formulaciones de administración sostenida o controlada. Los especialistas en la técnica también conocen técnicas para la formulación de una diversidad de otros medios de administración sostenida o controlada, tales como vehículos de liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de liberación prolongada. Véase, por ejemplo, el documento PCT/US93/00829, que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas.

Los ejemplos adicionales de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices de polímeros semipermeables en forma de artículos conformados; por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, poliláctidos (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919 y Patente Europea N° 058481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, 1983, *Biopolymers* 22: 547-56), poli(2-hidroxietil-metacrilato) (Langer *et al.*, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277 y Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12: 98-105), etilvinilacetato (Langer *et al.*, anteriormente) o ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico (Patente Europea N° 133988). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que pueden prepararse por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Eppstein *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3688-92; y Patentes Europeas N° 036676, 088046 y 143949.

La composición farmacéutica de TSLPR para usar para la administración *in vivo* debe ser, típicamente, estéril. Esto puede conseguirse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización usando este método puede realizarse antes de o después de la liofilización y reconstitución. La composición para la administración por vía parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en una solución. Además, las composiciones parenterales se colocan generalmente en un envase que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o como un polvo deshidratado o liofilizado. Dichas formulaciones pueden almacenarse en una forma lista para usar o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que requiere reconstitución antes de su administración.

En una realización específica, la presente invención se refiere a kits para producir una unidad de administración de dosis única. Cada uno de los kits puede contener tanto un primer envase que tiene una proteína seca como un

segundo envase que tiene una formulación acuosa. También se incluyen dentro del alcance de esta invención kits que contienen jeringas precargadas de cámara única o multicámara (por ejemplo, jeringas con un líquido y jeringas con un liofilizado).

5 La cantidad eficaz de una composición farmacéutica de TSLPR para emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y de los objetivos. Un especialista en la técnica entenderá que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán, por lo tanto, dependiendo en parte de la molécula que se administra, de la indicación para la que se está usando la molécula de TSLPR, de la vía de administración y del tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y del estado (la edad y salud general) del paciente.  
10 Por consiguiente, el médico puede graduar la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica puede variar desde aproximadamente 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores que se han mencionado anteriormente. En otras realizaciones, la dosificación puede variar desde 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o desde 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o desde 5 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg.

15 La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la molécula de TSLPR en la formulación que se usa. Típicamente, un médico administrará la composición hasta que se alcance una dosificación que consiga el efecto deseado. La composición puede administrarse, por lo tanto, como una dosis única o como dos o más dosis (que pueden o no contener la misma cantidad de la molécula deseada) en el tiempo, o como una infusión continua mediante un dispositivo de implante o catéter. El perfeccionamiento adicional de la dosificación apropiada se realiza de forma rutinaria por los especialistas en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas que realizan de forma rutinaria. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse a través del uso de datos de dosis-respuesta apropiados.

25 La vía de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con los métodos conocidos, por ejemplo, por vía oral; a través de inyección por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal o intralesional; mediante sistemas de liberación sostenida; o mediante dispositivos de implante. Cuando se desee, las composiciones pueden administrarse mediante inyección embolada o mediante infusión de forma continua, o mediante un dispositivo de implante.  
30

Como alternativa, o adicionalmente, la composición puede administrarse localmente mediante el implante de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada. Cuando se usa un dispositivo de implante, el dispositivo puede implantarse en cualquier órgano o tejido adecuado y la administración de la molécula deseada puede ser mediante difusión, bolo de liberación medida o administración continua.  
35

En algunos casos, puede ser deseable usar composiciones farmacéuticas de polipéptidos TSLPR de una manera *ex vivo*. En dichos casos, se exponen células, tejidos u órganos que han sido extirpados del paciente a composiciones farmacéuticas de polipéptido TSLPR, después de la cual las células, tejidos u órganos se implantan posteriormente de nuevo en el paciente.  
40

En otros casos, un polipéptido TSLPR puede administrarse mediante el implante de ciertas células que han sido modificadas por ingeniería genética, usando métodos como los que se describen en este documento para expresar y secretar el polipéptido TSLPR. Dichas células pueden ser células animales o humanas y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. Opcionalmente, las células pueden estar inmortalizadas. Para disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración de los tejidos adyacentes. Los materiales de encapsulación son típicamente recintos o membranas poliméricas biocompatibles semipermeables, que permiten la liberación del producto o productos proteicos pero evitan la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos adyacentes.  
45  
50

Como se analiza en este documento, puede ser deseable tratar poblaciones celulares aisladas (tales como células madre, linfocitos, glóbulos rojos, condrocitos, neuronas y similares) con uno o más polipéptidos TSLPR. Esto puede conseguirse mediante la exposición de las células aisladas directamente al polipéptido, cuando está en una forma que es permeable a la membrana celular.  
55

También se describen células y métodos (por ejemplo, recombinación homóloga y/o otros métodos de producción recombinante) tanto para la producción *in vitro* de polipéptidos terapéuticos como para la producción y administración de polipéptidos terapéuticos mediante terapia génica o terapia celular. Pueden usarse métodos de recombinación homóloga u otros para modificar una célula que contiene un gen de TSLPR normal transcripcionalmente silente o un gen subexpresado y producir, de este modo, un célula que exprese cantidades terapéuticamente eficaces de polipéptidos TSLPR.  
60

La recombinación homóloga es una técnica que se desarrolló originariamente para la dirección de genes para inducir o corregir mutaciones en genes transcripcionalmente activos. Kucherlapati, 1989, *Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol.* 36: 301. La técnica básica se desarrolló como un método para introducir mutaciones específicas en regiones  
65

específicas del genoma de mamíferos (Thomas *et al.*, 1986, *Cell* 44: 419-28; Thomas and Capecchi, 1987, *Cell* 51: 503-12; Doetschman *et al.*, 1988, *Proc Natl. Acad Sci. U.S.A.* 85: 8583-87) o para corregir mutaciones específicas dentro de genes defectuosos (Doetschman *et al.*, 1987, *Nature* 330: 576-78). Se describen técnicas de recombinación homóloga ejemplares en la Patente de Estados Unidos N° 5.272.071; en las Patentes Europeas N° 9193051 y 505500; en el documento PCT/US90/07642 y en la Publicación PCT N° WO 91/09955.)

Mediante la recombinación homóloga, la secuencia de ADN a insertar en el genoma puede dirigirse a una región específica del gen de interés mediante su unión con ADN de dirección. El ADN de dirección es una secuencia de nucleótidos que es complementaria (homóloga) a una región del ADN genómico. Se ponen en contacto pequeños fragmentos de ADN de dirección que son complementarios a una región específica del genoma con la cadena parental durante el proceso de replicación del ADN. Es una propiedad general del ADN que se ha insertado en una célula hibridar y, por lo tanto, recombinarse con otros fragmentos de ADN endógenos a través de regiones homólogas compartidas. Si esta cadena complementaria se une con un oligonucleótido que contiene una mutación o una secuencia diferente o un nucleótido adicional, también se incorpora en la cadena recién sintetizada como resultado de la recombinación. Como resultado de la función de lectura a prueba de errores es posible que la nueva secuencia de ADN sirva como molde. Por lo tanto, el ADN transferido se incorpora en el genoma.

Unidas a estos fragmentos de ADN de dirección hay regiones de ADN que pueden interactuar con o controlar la expresión de un polipéptido TSLPR, por ejemplo, secuencias flanqueantes. Por ejemplo, un elemento promotor o potenciador, un supresor o un elemento modulador de la transcripción exógeno se inserta en el genoma de la célula hospedadora deseada próximo a y en orientación suficiente para influir en la transcripción del ADN que codifica el polipéptido TSLPR deseado. El elemento de control controla una porción del ADN presente en el genoma de la célula hospedadora. Por lo tanto, la expresión del polipéptido TSLPR deseado puede conseguirse, no mediante transfección de ADN que codifica el gen de TSLPR en sí, sino mediante el uso de ADN de dirección (que contiene regiones de homología con el gen endógeno de interés) acoplado con segmentos reguladores del ADN que proporcionan la secuencia génica endógena con señales reconocibles para la transcripción de un gen de TSLPR.

En un método ejemplar, la expresión de un gen de dirección deseado en una célula (es decir, un gen celular endógeno deseado) se altera por recombinación homóloga en el genoma celular en un sitio preseleccionado, mediante la introducción de un ADN que incluye al menos una secuencia regulador, un exón y un sitio donante de corte y empalme. Estos componentes se introducen en el ADN cromosómico (genómico) de tal modo que, en efecto, dé como resultado la producción de una nueva unidad de transcripción (en la que la secuencia reguladora, el exón y el sitio donante de corte y empalme presentes en la construcción de ADN están unidos operativamente al gen endógeno). Como resultado de la introducción de estos componentes en el ADN cromosómico, se altera la expresión del gen endógeno deseado.

La expresión génica alterada, como se describe en este documento incluye la activación (o la provocación de que se exprese) un gen que está normalmente silente (no expresado) en la célula que se obtiene, así como el aumento de la expresión de un gen que no se expresa a niveles fisiológicamente significativos en la célula que se obtiene. Las realizaciones incluyen además cambiar el patrón de regulación o inducción de tal modo que sea diferente del patrón de regulación o de inducción que se produce en la célula que se obtiene y reducir (incluyendo eliminar) la expresión de un gen que se expresa en la célula que se obtiene.

Un método por el que puede usarse recombinación homóloga para aumentar o provocar la producción de polipéptido TSLPR a partir un gen de TSLPR endógeno de una célula implica usar primero recombinación homóloga para colocar una secuencia de recombinación de un sistema de recombinación específico de sitio (por ejemplo, Cre/loxP, FLP/FRT) (Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5: 521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225: 890-900) cadena arriba de (es decir, 5' a) una región codificante del polipéptido TSLPR genómico endógeno de la célula. Un plásmido que contenía un sitio de recombinación homóloga al sitio que se colocó justo cadena arriba de la región codificante del polipéptido TSLPR genómico se introduce en la línea celular modificada junto con la enzima recombinasa apropiada. Esta recombinasa provoca que el plásmido se integre, mediante el sitio de recombinación del plásmido, en el sitio de recombinación localizado justo cadena arriba de la región codificante del polipéptido TSLPR genómico en la línea celular (Baubonis y Sauer, 1993, *Nucleic Acids Res.* 21: 2025-29; O'Gorman *et al.*, 1991, *Science* 251: 1351-55). Cualquier secuencia flanqueante conocida que aumente la transcripción (por ejemplo, un potenciador o promotor, intrón o potenciador de la traducción), si está adecuadamente colocada en el plásmido, se integraría de tal modo que genere una unidad transcripcional nueva o modificada que dé como resultado la producción *de novo* o aumentada del polipéptido TSLPR a partir del gen de TSLPR endógeno de la célula.

Un método adicional para usar la línea celular en la que se ha colocado una secuencia de recombinación específica de sitio justo cadena arriba de la región codificante del polipéptido TSLPR genómico endógeno de la célula es usar la recombinación homóloga para introducir un segundo sitio de recombinación en cualquier parte del genoma de la línea celular. Después, se introduce la enzima recombinasa apropiada en la línea celular de dos sitios de recombinación, provocando un acontecimiento de recombinación (deleción, inversión y translocación) (Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5: 521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225: 890-900) que generaría una unidad transcripcional nueva o modificada que dará como resultado la producción *de novo* o aumentada del polipéptido TSLPR a partir del gen de TSLPR endógeno de la célula.

Un planteamiento adicional para aumentar o provocar la expresión del polipéptido TSLPR a partir de un gen de TSLPR endógeno de la célula implica aumentar o provocar la expresión de un gen o genes (por ejemplo, factores de transcripción) y/o disminuir la expresión de un gen o genes (por ejemplo, represores transcripcionales) de una forma que de cómo resultado la producción *de novo* o aumentada del polipéptido TSLPR a partir del gen de TSLPR endógeno de la célula. Este método incluye la introducción de un polipéptido de origen no natural (por ejemplo, un polipéptido que comprende un dominio de unión a ADN específico de sitio fusionado con un dominio de factor transcripcional) en la célula de tal modo que dé como resultado la producción *de novo* o aumentada de polipéptido TSLPR a partir del gen de TSLPR endógeno de la célula.

Se describen además construcciones de ADN útiles en el método de alterar la expresión de un gen diana. En ciertas realizaciones, las construcciones de ADN ejemplares comprenden: (a) una o más secuencias de dirección, (b) una secuencia reguladora, (c) un exón y (d) un sitio donante de corte y empalme desemparejado. La secuencia de dirección en la construcción de ADN dirige la integración de los elementos (a) - (d) en un gen diana en una célula de tal modo que los elementos (b) - (d) estén unidos operativamente a las secuencias del gen diana endógeno. En otra realización, las construcciones de ADN comprenden: (a) una o más secuencias de dirección, (b) una secuencia reguladora, (c) un exón, (d) un sitio donante de corte y empalme, (e) un intrón y (f) un sitio aceptor de corte y empalme, en las que la secuencia de dirección dirige la integración de los elementos (a) - (f) de tal modo que los elementos (b) - (f) estén unidos operativamente al gen endógeno. La secuencia de dirección es homóloga al sitio preseleccionado en el ADN cromosómico celular con el que se va a producir la recombinación homóloga. En la construcción, el exón está generalmente en posición 3' de la secuencia reguladora y el sitio donante de corte y empalme está en posición 3' del exón.

Si se conoce la secuencia de un gen en particular, tal como la secuencia de ácido nucleico del polipéptido TSLPR que se presenta en este documento, un fragmento de ADN que sea complementario a una región seleccionada del gen puede sintetizarse u obtenerse de otro modo, tal como mediante restricción apropiada del ADN nativo en sitios de reconocimiento específicos que se unen a la región de interés. Este fragmento sirve como secuencia de dirección tras la inserción en la célula e hibridará con su región homóloga dentro del genoma. Si esta hibridación se produce durante la replicación del ADN, este fragmento de ADN y cualquier secuencia adicional que esté unida al mismo, actuará como un fragmento Okazaki y se incorporará en la cadena de ADN hija recién sintetizada. También se describen en este documento nucleótidos que codifican un polipéptido TSLPR, pudiendo usarse los nucleótidos como secuencias de dirección.

También se contempla la terapia celular de polipéptidos TSLPR, por ejemplo, el implante de células que producen polipéptidos TSLPR. Esto implica implantar células capaces de sintetizar y secretar una forma biológicamente activa del polipéptido TSLPR. Dichas células productoras de polipéptido TSLPR pueden ser células que sean productoras naturales de polipéptidos TSLPR o pueden ser células recombinantes cuya capacidad para producir polipéptidos TSLPR se haya aumentado mediante la transformación con un gen que codifique el polipéptido TSLPR deseado o con un gen que aumente la expresión del polipéptido TSLPR. Dicha modificación puede conseguirse por medio de un vector adecuado para administrar el gen, así como promover su expresión y secreción. Para minimizar una reacción inmunológica potencial en pacientes a los que se administra un polipéptido TSLPR, como puede ocurrir con la administración de un polipéptido de una especie extraña, se prefiere que las células naturales que producen polipéptido TSLPR sean de origen humano y produzcan polipéptido TSLPR humano. Así mismo se prefiere que las células recombinantes que producen polipéptido TSLPR se transformen con un vector de expresión que contenga un gen que codifique un polipéptido TSLPR humano.

Las células implantadas pueden estar encapsuladas para evitar la infiltración de tejidos adyacentes. Pueden implantarse células animales humanas o no humanas en pacientes en recintos o membranas poliméricas semipermeables biocompatibles que permitan la liberación del polipéptido TSLPR, pero que eviten la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales del tejido adyacente. Como alternativa, las células propias del paciente, transformadas para que produzcan polipéptidos TSLPR *ex vivo*, pueden implantarse directamente en el paciente sin dicha encapsulación.

Se conocen en el campo técnicas para la encapsulación de células vivas y para la preparación de las células encapsuladas y su implante en pacientes puede conseguirse de forma rutinaria. Por ejemplo, Baetge *et al.* (Publicaciones PCT N° WO95/05452 y PCT/US94/09299) describen cápsulas de membranas que contienen células modificadas por ingeniería genética para la administración eficaz de moléculas biológicamente activas. Las cápsulas son biocompatibles y son fácilmente recuperables. Las cápsulas encapsulan células transfectadas con moléculas de ADN recombinante que comprenden secuencias de ADN que codifican moléculas biológicamente activas unidas operativamente con promotores que no están sometidos a regulación negativa *in vivo* tras el implante en un hospedador mamífero. Los dispositivos proporcionan la administración de las moléculas a partir de células vivas en sitios específicos dentro de un destinatario. Además, véanse las Patentes de Estados Unidos N° 4.892.538; 5.011.472; y 5.106.627. Se describe un sistema para encapsular células vivas en la Publicación PCT N°. WO91/10425 (Aebischer *et al.*). Véanse también, la Publicación PCT N° WO91/10470 (Aebischer *et al.*); Winn *et al.*, 1991, *Exper. Neurol.* 113: 322-29, Aebischer *et al.*, 1991, *Exper. Neurol.*, 111: 269-75, y Tresco *et al.*, 1992, *ASAIO* 38: 17-23).

También se describe la administración de terapia génica de polipéptidos TSLPR *in vivo* e *in vitro*. Un ejemplo de una técnica de terapia génica es el uso del gen de TSLPR (ADN genómico, ADNc y/o ADN sintético) que codifica un polipéptido TSLPR que puede estar unido operativamente a un promotor constitutivo o inducible para formar una "construcción de ADN para terapia génica". El promotor puede ser homólogo o heterólogo al gen de TSLPR endógeno, con tal de que sea activo en el tipo celular o tisular en el que se insertará la construcción. Otros componentes de la construcción de ADN de terapia génica pueden incluir opcionalmente moléculas de ADN diseñadas para su integración específica de sitio (por ejemplo, secuencias endógenas útiles para recombinación homóloga), promotores específicos de tejido, potenciadores o silenciadores, moléculas de ADN capaces de proporcionar una ventaja selectiva sobre la célula parental, moléculas de ADN útiles como marcadores para identificar células transformadas, sistemas de selección negativa, agentes de unión específica a células (tales como, por ejemplo, para la dirección celular), factores de internalización específicos de células, factores de transcripción que potencien la expresión a partir de un vector y factores que permitan la producción de vectores.

Una construcción de ADN para terapia génica puede introducirse después en la células (*ex vivo* o *in vivo*) usando vectores virales o no virales. Un medio para introducir la construcción de ADN para terapia génica es por medio de vectores virales, como se describe en este documento. Ciertos vectores, tales como vectores retrovirales, administrarán la construcción de ADN al ADN cromosómico de las células y el gen puede integrarse en el ADN cromosómico. Otros vectores funcionarán como episomas y la construcción de ADN de terapia génica permanecerá en el citoplasma.

En otras realizaciones más pueden incluirse elementos reguladores para la expresión controlada del gen de TSLPR en la célula diana. Dichos elementos se activan en respuesta a un efector apropiado. De esta forma, un polipéptido terapéutico puede expresarse cuando se desee. Un medio de control convencional implica el uso de pequeñas moléculas dimerizadoras o rapalogs para dimerizar proteínas quiméricas que contienen un dominio de unión a moléculas pequeñas y un dominio capaz de iniciar un proceso biológico, tal como una proteína de unión a ADN o una proteína de activación de la transcripción (véanse las Publicaciones PCT N° WO 96/41865, WO 97/31898 y WO 97/31899). La dimerización de las proteínas puede usarse para iniciar la transcripción del transgén.

Una tecnología de regulación alternativa usa un método para almacenar proteínas expresadas a partir del gen de interés en el interior de la célula como un agregado o agrupación. El gen de interés se expresa como una proteína de fusión que incluye un dominio de agregación condicional que da como resultado la retención de la proteína agregada en el retículo endoplasmático. Las proteínas almacenadas son estables e inactivas en el interior de la célula. Las proteínas pueden liberarse, sin embargo, mediante la administración de un fármaco (por ejemplo, un ligando molecular pequeño) que elimine el dominio de agregación condicional y, por lo tanto, rompa específicamente los agregados o agrupaciones de tal modo que las proteínas puedan secretarse de la célula. Véanse, Aridor *et al.*, 2000, *Science* 287: 816-17 y Rivera *et al.*, 2000, *Science* 287: 826-30.

Otros medios de control adecuados o interruptores genéticos incluyen, pero sin limitación, los sistemas que se describen en este documento. Se usa Mifepristone (RU486) como un antagonista de la progesterona. La unión de un dominio de unión a ligando de receptor de progesterona modificado con el antagonista de progesterona activa la transcripción mediante la formación de un dímero de dos factores de transcripción que después pasan hacia el interior del núcleo para unirse con el ADN. El dominio de unión a ligando se modifica para eliminar la capacidad del receptor de unirse con el ligando natural. El sistema de receptor de hormonas esteroideas se describe adicionalmente en la Patente de Estados Unidos n° 5.364.791 y en las Publicaciones PCT N° WO 96/04911 y WO 97/10337.

Otro sistema de control más usa ecdysona (una hormona esteroidea de la mosca de la fruta) que se une a y activa un receptor de ecdysona (receptor citoplasmático). Después el receptor se transloca al núcleo para unirse a un elemento de respuesta de ADN específico (promotor del gen sensible a ecdysona). El receptor de ecdysona incluye un dominio de transactivación, un dominio de unión al ADN y un dominio de unión a ligando para iniciar la transcripción. El sistema de ecdysona se describe adicionalmente en la Patente de Estados Unidos N°. 5.514.578 y en las Publicaciones PCT N°. WO 97/38117, WO 96/37609 y WO 93/03162.

Otro medio de control usa un transactivador positivo controlable por tetraciclina. Este sistema implica un dominio de unión a ADN de proteína represora *tet* mutada (*tet* R-4 mutada con cambios aminoacídicos que dan como resultado una proteína transactivadora inversa regulada por tetraciclina, es decir, que se une a un operador *tet* en presencia de tetraciclina) unido a un polipéptido que activa la transcripción. Dichos sistemas se describen en las Patentes de Estados Unidos N°. 5.464.758, 5.650.298 y 5.654.168.

Se describen construcciones de ácidos nucleicos y sistemas de control de la expresión adicionales en las Patentes de Estados Unidos N° 5.741.679 y 5.834.186, de Innovir Laboratorios Inc.

Puede conseguirse una terapia génica *in vivo* mediante la introducción del gen que codifica el polipéptido TSLPR en células mediante la inyección local de una molécula de ácido nucleico de TSLPR o mediante otros vectores de administración virales o no virales apropiados. Hefti, 1994, *Neurobiology* 25: 1418-35. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido TSLPR puede estar contenida en un vector de virus adenoasociado (AAV)

para su administración en las células a las que se dirige (véanse, por ejemplo, Johnson, Publicación PCT N° WO 95/34670; y Solicitud PCT N° PCT/US95/07178). Típicamente, el genoma de AAV recombinante contiene repeticiones terminales invertidas de AAV flanqueando una secuencia de ADN que codifica un polipéptido TSLPR unido operativamente a un promotor funcional y a secuencias de poliadenilación.

5 Los vectores virales adecuados alternativos incluyen, pero sin limitación, retrovirus, adenovirus, virus herpes simple, lentivirus, virus de la hepatitis, parvovirus, papovavirus, poxvirus, alfavirus, coronavirus, rhabdovirus, paramixovirus y vectores de virus del papiloma. La Patente de Estados Unidos N° 5.672.344 describe un sistema de transferencia génica mediada por virus *in vivo* que implica un vector HSV-1 neurotrófico recombinante. La Patente de Estados Unidos N° 5.399.346 proporciona ejemplos de un proceso para proporcionar a un paciente una proteína terapéutica mediante la administración de células humanas que han sido tratadas *in vitro* para insertar un segmento de ADN que codifica una proteína terapéutica. Se describen métodos adicionales y materiales para la práctica de técnicas de terapia génica en las Patentes de Estados Unidos N° 5.631.236 (que implica vectores adenovirales), 5.672.510 (que implica vectores retrovirales), 5.635.399 (que implica vectores retrovirales que expresan citoquinas).

15 Los métodos de administración no virales incluyen, pero sin limitación, transferencia mediada por liposomas, administración de ADN desnudo (inyección directa), transferencia mediada por receptor (complejo ADN-ligando), electroporación, precipitación con fosfato cálcico y bombardeo de micropartículas (por ejemplo, pistola génica). Los materiales y métodos de terapia génica también pueden incluir promotores inducibles, potenciadores-promotores específicos de tejido, secuencias de ADN diseñadas para la integración específica de sitio, secuencias de ADN capaces de proporcionar una ventaja selectiva sobre la célula parental, marcadores para identificar células transformadas, sistemas de selección negativa y sistemas de control de la expresión (medidas de seguridad), agentes de unión específica a células (para dirigirse a células), factores de internalización específicos de células y factores de transcripción para potenciar la expresión mediante un vector, así como métodos para la fabricación de vectores. Dichos métodos y materiales adicionales para la práctica de las técnicas de terapia génica se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 4.970.154 (que implica técnicas de electroporación), 5.679.599 (que describe un sistema que contiene lipoproteínas para la administración génica), 5.676.954 (que implica vehículos de liposomas), 5.593.875 (que describe métodos para la transfección por fosfato cálcico) y 4.945.050 (que describe un proceso en el que se propulsan partículas biológicamente activas en células a una velocidad a la que las partículas penetran la superficie de las células y se incorporan en el interior de las células) y la Publicación PCT N° WO 96/40958 (que implica ligandos nucleares).

35 También se contempla que la terapia génica o terapia celular de TSLPR puede incluir además la administración de uno o más polipéptidos adicionales en la misma o en células diferentes. Dichas células pueden introducirse por separado en el paciente, o las células pueden contenerse en un único dispositivo implantable, tal como la membrana de encapsulación que se ha descrito anteriormente, o las células pueden modificarse por separado por medio de vectores virales.

40 Un medio para aumentar la expresión del polipéptido TSLPR endógena en una célula mediante terapia génica es insertar uno o más elementos potenciadores en el promotor del polipéptido TSLPR, en el que los elementos potenciadores pueden servir para aumentar la actividad transcripcional del gen de TSLPR. Los elementos potenciadores que se usen se seleccionarán en base al tejido en el que se desee activar el gen —se seleccionarán elementos potenciadores que se sabe que confieren la activación del promotor en ese tejido. Por ejemplo, si debe "activarse" un gen que codifica un polipéptido TSLPR en células T, puede usarse el elemento potenciador del promotor *lck*. Aquí, la porción funcional del elemento transcripcional que se añade puede insertarse en un fragmento de ADN que contiene el promotor del polipéptido TSLPR (y, opcionalmente, insertarse en un vector y/o secuencias flanqueantes 5' y/o 3') usando técnicas de clonación convencionales. Esta construcción, conocida como "construcción de recombinación homóloga" puede introducirse después en las células deseadas *ex vivo* o *in vivo*.

50 También puede usarse terapia génica para disminuir la expresión del polipéptido TSLPR mediante la modificación de la secuencia de nucleótidos del promotor endógeno. Dicha modificación se consigue, típicamente, mediante métodos de recombinación homóloga. Por ejemplo, una molécula de ADN que contiene toda o una porción del promotor del gen de TSLPR seleccionado para su inactivación puede modificarse por ingeniería genética para eliminar y/o reemplazar fragmentos del promotor que regulan la transcripción. Por ejemplo, puede delecionarse la caja TATA y/o el sitio de unión de un activador de la transcripción del promotor usando técnicas de biología molecular convencionales; dicha delección puede inhibir la actividad del promotor, reprimiendo de este modo la transcripción del gen de TSLPR correspondiente. La delección de la caja TATA o del sitio de unión del activador de la transcripción en el promotor puede llevarse a cabo mediante la generación de una construcción de ADN que comprenda toda o la porción pertinente del promotor del polipéptido TSLPR (de la misma o de una especie relacionada a la del gen de TSLPR que se va a regular) en la que uno o más de los nucleótidos de la caja TATA y/o del sitio de unión del activador de la transcripción se mutan mediante sustitución, delección y/o inserción de uno o más nucleótidos. Como resultado, la caja TATA y/o el sitio de unión del activador disminuyen su actividad o se inactivan completamente. Esta construcción, que también contendrá, típicamente, al menos aproximadamente 500 bases de ADN que se corresponden con las secuencias de ADN 5' y 3' nativas (endógenas) adyacentes en el segmento del promotor que se ha modificado, puede introducirse en las células apropiadas (*ex vivo* o *in vivo*) directamente o mediante un vector viral, como se describe en este documento. Típicamente, la integración de la

construcción en el ADN genómico de las células será mediante recombinación homóloga, en la que la secuencias de ADN 5' y 3' en la construcción del promotor pueden servir para ayudar a integrar la región promotora modificada mediante hibridación con el ADN cromosómico endógeno.

## 5 Usos terapéuticos

10 Pueden usarse moléculas de ácido nucleico de TSLPR, polipéptidos y agonistas y antagonistas del mismo para tratar, diagnosticar, aliviar o prevenir varias enfermedades, trastornos o afecciones, incluyendo enfermedades, trastornos o afecciones relacionadas con TSLP. Las enfermedades, trastornos o afecciones relacionadas con TSLP pueden estar relacionadas con el desarrollo de células B, el desarrollo de células T, la reorganización de genes de receptores de células T o la regulación del factor de transcripción Sta5. Se incluyen dentro del alcance de la invención las enfermedades causadas o mediadas por niveles indeseables de TSLP. Los niveles indeseables de TSLP incluyen niveles de TSLP excesivos y niveles de TSLP por debajo de lo normal.

15 Los agonistas y antagonistas del polipéptido TSLPR incluyen las moléculas que regulan la actividad del polipéptido TSLPR y aumentan o disminuyen al menos una actividad de la forma madura del polipéptido TSLPR. Los agonistas o antagonistas pueden ser co-factores, tales como una proteína, péptido, hidrato de carbono, lípido o molécula de pequeño peso molecular, que interaccionen con el polipéptido TSLPR y, de este modo, regulen su actividad. Los agonistas o antagonistas del polipéptido potenciales incluyen anticuerpos que reaccionan con formas solubles o unidas a membranas de polipéptidos TSLPR, que comprenden parte o todos los dominios extracelulares de dichas proteínas. Las moléculas que regulan la expresión del polipéptido TSLPR incluyen, típicamente, ácidos nucleicos que codifican el polipéptido TSLPR que pueden actuar como reguladores antisentido en la expresión.

20 Pueden usarse moléculas de ácido nucleico de TSLPR, polipéptidos y agonistas y antagonistas de las mismas (simultáneamente o secuencialmente) en combinación con una o más citoquinas, factores de crecimiento, antibióticos, antiinflamatorios y/o agentes quimioterápicos según sea apropiado para la afección que se trate.

25 Otras enfermedades o trastornos causados por o mediados por niveles indeseables de polipéptidos TSLPR se incluyen dentro del alcance de la invención. Los niveles indeseables incluyen niveles excesivos de polipéptidos TSLPR y niveles por debajo de lo normal de polipéptidos TSLPR.

## Usos de ácidos nucleicos y polipéptidos TSLPR

35 Las moléculas de ácido nucleico de la invención (incluyendo las que no codifican polipéptidos biológicamente activos en sí) pueden usarse para mapear las localizaciones del gen de TSLPR y genes relacionados en cromosomas. El mapeo puede realizarse mediante técnicas conocidas en el campo, tales como amplificación por PCR e hibridación *in situ*.

40 Pueden ser útiles moléculas de ácido nucleico de TSLPR (incluyendo las que no codifican polipéptidos biológicamente activos en sí) como sondas de hibridación en ensayos de diagnóstico para analizar, cualitativa o cuantitativamente, la presencia de una molécula de ácido nucleico de TSLPR en muestras de tejido o fluido corporal de mamíferos.

45 También pueden emplearse otros métodos cuando es deseable inhibir la actividad de uno o más polipéptidos TSLPR. Dicha inhibición puede efectuarse mediante moléculas de ácido nucleico que sean complementarias a y que hibriden con secuencias de control de la expresión (formación de triple hélice) o con ARNm de TSLPR. Por ejemplo, pueden introducirse en la célula moléculas de ADN o ARN antisentido que tengan una secuencia que sea complementaria con al menos una porción de un gen de TSLPR. Pueden diseñarse sondas antisentido mediante técnicas disponibles usando la secuencia del gen TSLPR que se describe en este documento. Típicamente, cada una de dichas moléculas antisentido será complementaria al sitio de inicio (extremo 5') de cada gen de TSLPR seleccionado. Después, cuando la molécula antisentido hibrida con el correspondiente ARNm de TSLPR, se impide o se reduce la traducción de este ARNm. Los inhibidores antisentido proporcionan información con respecto a la disminución o ausencia de un polipéptido TSLPR en una célula u organismo.

55 Como alternativa, puede emplearse terapia génica para generar un inhibidor negativo dominante de uno o más polipéptidos TSLPR. En esta situación, el ADN que codifica un polipéptido mutante de cada polipéptido TSLPR seleccionado puede prepararse e introducirse en las células de un paciente usando métodos virales o no virales que se describen en este documento. Cada uno de dichos mutantes se diseña típicamente para competir con el polipéptido endógeno en su papel biológico.

60 Además, un polipéptido TSLPR, ya sea biológicamente activo o no, puede usarse como inmunógeno, es decir, el polipéptido contiene al menos un epítipo contra el que pueden generarse anticuerpos. Los agentes de unión selectiva que se unen a un polipéptido TSLPR (como se describe en este documento) pueden usarse para fines de diagnóstico *in vivo* o *in vitro*, incluyendo, pero sin limitación, su uso en forma marcada para detectar la presencia del polipéptido TSLPR en una muestra celular o de fluido corporal. Los anticuerpos también pueden usarse para prevenir, tratar o diagnosticar varias enfermedades y trastornos, incluyendo las que se enumeran en este

documento. Los anticuerpos pueden unirse a un polipéptido TSLPR de tal modo que disminuyan o bloqueen al menos una actividad característica de un polipéptido TSLPR, o pueden unirse a un polipéptido para aumentar al menos una actividad característica de un polipéptido TSLPR (incluyendo el aumento de la farmacocinética del polipéptido TSLPR).

5 Los ácidos nucleicos de TSLPR murino y humano de la presente invención también son herramientas útiles para aislar los genes de los polipéptidos TSLPR cromosómicos correspondientes. Por ejemplo, puede usarse ADN cromosómico de ratón que contiene secuencias de TSLPR para generar ratones *knock out*, permitiendo de este modo un examen del papel del polipéptido TSLPR *in vivo*. El ADN genómico de TSLPR humano puede usarse para  
10 identificar enfermedades de degeneración tisular hereditarias.

Se pretende que los siguientes ejemplos tengan fines ilustrativos solamente y de ningún modo deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

#### 15 Ejemplo 1: Clonación de los genes del polipéptido TSLPR murino y humano

Generalmente se usan materiales y métodos que se describen en Sambrook *et al*; anteriormente, para clonar y analizar los genes que codifican polipéptidos TSLPR murinos y humanos.

20 Se identificaron las secuencias que codifican el polipéptido TSLPR murino en una búsqueda de BLAST de una base de datos de EST usando las secuencias que se corresponden con el dominio citoplasmático del receptor de eritropoyetina. Se obtuvieron varias EST murinas solapantes que codifican una nueva molécula de receptor de citoquinas de tipo I en la búsqueda de BLAST. El dominio citoplasmático del receptor de citoquinas codificado por estas secuencias se descubrió que compartía una similitud significativa con la cadena  $\gamma$  del receptor de citoquinas común ( $\gamma_c$ ), el receptor de eritropoyetina y la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-9.  
25

La cadena  $\gamma$  del receptor de citoquinas común es una subunidad esencial de los receptores para IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15 (Noguchi *et al.*, 1993, *Science* 262: 1877-80; Kondo *et al.*, 1994, *Science* 263: 1453-54; Kondo *et al.*, 1993, *Science* 262: 1874-77; Russell *et al.*, 1994, *Science* 266: 1042-45; Takeshita *et al.*, 1992, *Science* 257: 379-82; Russell *et al.*, 1993, *Science* 262: 1880-83; Giri *et al.*, 1994, *EMBO J.* 13: 2822-30; Kimura *et al.*, 1995, *Int. Immunol.* 7: 115-20). La mutación de  $\gamma_c$  en seres humanos puede dar como resultado una inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X (Noguchi *et al.*, 1993, *Gen* 73: 147-57; Leonard *et al.*, 1995, *Immunol. Rev.* 148: 97-114).  
30

Puesto que ninguna de las secuencias de EST identificadas en la búsqueda de BLAST contenía la fase de lectura abierta completa para el polipéptido TSLPR, se exploró una genoteca de embrión de ratón para obtener un ADNc de longitud completa. La colonia positiva que contenía el inserto de mayor longitud se usó para preparar ADN plasmídico por métodos convencionales. El inserto de ADNc de esta colonia tenía una longitud de 2 kb. El análisis de secuencia de ADN confirmó que el clon contenía la fase de lectura completa para el polipéptido TSLPR.  
35

El análisis de secuencia del ADNc de longitud completa para el polipéptido TSLPR murino indicaba que el gen comprende una fase de lectura abierta de 1110 pb que codifica una proteína de 370 aminoácidos y posee un péptido señal potencial de 17 aminoácidos de longitud en su extremo amino-terminal (Figuras 1A-1B; el péptido señal predicho se indica mediante subrayado). Se descubrió que la fase de lectura abierta codifica una proteína transmembrana de tipo I que tiene dos sitios de glicosilación ligados a N potenciales y un dominio citoplasmático de 104 aminoácidos que contiene un solo resto de tirosina.  
40  
45

Por el contrario,  $\gamma_c$  murino comprende 369 aminoácidos y tiene un dominio citoplasmático de 86 aminoácidos que contiene dos restos de tirosina (Kumaki *et al.*, 1993, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193: 356-63; Cao *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 8464-68; Kobayash *et al.*, 1993, *Gene* 130: 303-04). La Figura 2 ilustra un alineamiento de secuencia de aminoácidos de polipéptido TSLPR murino (secuencia superior) y  $\gamma_c$  murino (secuencia inferior). Se descubrió que el polipéptido TSLPR murino comparte una identidad de secuencia del 26% y una similitud de secuencia del 47% con  $\gamma_c$  a nivel de aminoácidos. La secuencia del polipéptido TSLPR murino es algo atípica para los receptores de citoquinas de tipo I por el hecho de que sólo se conserva una pareja de cisteínas y el motivo W-S-X-W-S (SEC ID N°: 15) se reemplaza por un motivo W-T-A-V-T (SEC ID N°: 16). El peso molecular predicho del polipéptido TSLPR murino es de 37 kD.  
50  
55

Se identificaron las secuencias que codifican el polipéptido TSLPR humano en una búsqueda de BLAST de una base de datos patentada de secuencias de ADNc (Amgen, Thousand Oaks, CA) usando la secuencia de ácido nucleico de TSLPR murino como una secuencia problema. Se identificaron dos clones que contenían secuencias de ADNc humano y compartían la mayor homología con la secuencia de ácido nucleico de TSLPR murino en esta búsqueda: 9604927 (SEC ID N°: 10) y 9508990 (SEC ID N°: 11). El análisis de secuencia del ADNc de longitud completa para el polipéptido TSLPR humano (como está contenida en el clon 96049279) indicaba que el gen de TSLPR humano comprende una fase de lectura abierta de 1113 pb que codifica una proteína de 371 aminoácidos y posee un péptido señal potencial de 22 aminoácidos de longitud en su extremo amino-terminal (Figuras 3A-3B; el péptido señal predicho se indica mediante subrayado).  
60  
65

El clon 9508990 contiene una fase de lectura abierta de 1137 pb que codifica una proteína de 379 aminoácidos (Figuras 4A-4B). Este clon comprende esencialmente la secuencia polipeptídica de TSLPR humano de longitud completa y 8 aminoácidos adicionales en el extremo carboxilo terminal que se corresponden con el epítipo FLAG. La Figura 5 ilustra un alineamiento de secuencias de aminoácidos del polipéptido TSLPR murino (secuencia superior) y el polipéptido TSLPR humano (secuencia inferior). La disponibilidad de secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de TSLPR humano contribuirá adicionalmente a elucidar las rutas de transducción de señales utilizadas por TSLP.

#### Ejemplo 2: Expresión del Polipéptido TSLPR

Se transcribió y tradujo *in vitro* una construcción de ADNc que codifica la fase de lectura abierta completa para TSLPR murino en presencia de <sup>35</sup>S-metionina y el producto se resolvió mediante SDS-PAGE. La Figura 6A ilustra un autorradiograma del gel en el que se obtiene una sola especie de aproximadamente 40 kD.

La Figura 6B ilustra la inmunoprecipitación del polipéptido TSLPR murino en la línea de células pre-B dependiente de factor de crecimiento NAG8/7 usando un antisuero policlonal de conejo generado contra el dominio extracelular del polipéptido TSLPR murino. El antisuero policlonal de conejo se generó contra la proteína de fusión de polipéptido TSLPR murino-glutathion S-transferasa que se clonó en el vector de expresión pGEX4T2 (Pharmacia) y se expresó en bacterias. Antes del marcaje metabólico, se cultivaron células NAG8/7 en RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10%, antibióticos y TSLP.

Se marcaron metabólicamente células NAG8/7 con <sup>35</sup>S-metionina y cisteína, se lisaron en Tris 50 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1% e inhibidores de proteasa y los lisados se incubaron durante una noche con antisuero policlonal de conejo (carril 2) o suero preinmune (carril 1). Los inmunocomplejos se capturaron con proteína G-sepharose, se lavaron en tampón de lisis y después se resolvieron mediante SDS-PAGE. El antisuero policlonal inmunoprecipitaba específicamente una banda ancha de aproximadamente 50 kD en una línea de células pre-B NAG8/7 (Figura 6B). El mayor tamaño del producto inmunoprecipitado en comparación con el producto generado por traducción *in vitro* concuerda con la adición de restos de hidratos de carbono ligados a N en el dominio extracelular. El análisis citométrico de flujo de células 293 transfectadas y varias líneas celulares hematopoyéticas (es decir, 32D, BaF3 y WEHI-3) confirmó que el TSLPR murino se expresaba en la superficie celular.

#### Ejemplo 3: Expresión de ARNm de TSLPR

La distribución tisular de TSLPR murino se examinó mediante análisis de transferencia de northern. Se exploró una transferencia de northern de múltiples tejidos de ratón (Clontech, Palo Alto, CA) con una sonda de ADNc de TSLPR marcada con <sup>32</sup>P usando técnicas convencionales. Se detectaron los transcritos de ARNm de TSLPR murino en casi todos los tejidos examinados, detectándose los mayores niveles de expresión en el pulmón, hígado y testículo (Figura 6C). Se detectaron niveles inferiores de expresión en el corazón, cerebro, bazo y músculo esquelético. Se detectaron dos transcritos de aproximadamente 2 kb y 2,2 kb en algunos tejidos, mientras que se detectó solamente un único transcrito de aproximadamente 2 kb en otros tejidos. La amplia distribución tisular del ARNm de TSLPR murino difiere del patrón linfo-hematopoyético relativamente restringido de la expresión observada para  $\gamma_c$ .

La expresión de ARNm de TSLPR puede localizarse mediante hibridación *in situ* de la forma siguiente. Un panel de tejidos de ratón adulto y embrionario normal se fijan en paraformaldehído al 4%, se embeben en parafina y se seccionan a 5  $\mu$ m. Los tejidos seccionados se permeabilizan en HCl 0,2 M, se digieren con Proteinasa K y se acetilan con trietanolamina y anhídrido acético. Las secciones se hibridan previamente durante 1 hora a 60°C en solución de hibridación (NaCl 300 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, EDTA 5 mM, solución de Dehardt 1X, SDS al 0,2%, DTT 10 mM, ARNt 0,25 mg/ml, poliA 25  $\mu$ g/ml, poliC 25  $\mu$ g/ml y formamida al 50%) y después se hibridan durante una noche a 60°C en la misma solución que contiene dextrano al 10% y  $2 \times 10^4$  cpm/ $\mu$ l de una ribosonda antisentido marcada con <sup>33</sup>P complementaria al gen de TSLPR humano. La ribosonda se obtiene por transcripción *in vitro* de un clon que contiene secuencias de ADNc de TSLPR humano usando técnicas convencionales.

Después de la hibridación, las secciones se aclaran en solución de hibridación, se tratan con ARNasa A para digerir la sonda no hibridada y después se lavan en SSC 0,1X a 55°C durante 30 minutos. Después, las secciones se sumergen en emulsión de NTB-2 (Kodak, Rochester, NY), se exponen durante 3 semanas a 4°C, se revelan y se realiza una contratinción con hematoxicilina y eosina. Se analiza simultáneamente la morfología tisular y la señal de hibridación mediante iluminación de campo oscuro y convencional para cerebro (una sección sagital y dos coronales), tracto gastrointestinal (esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, colon proximal y colon distal), glándula pituitaria, hígado, pulmón, corazón, bazo, timo, ganglios linfáticos, riñón, glándula adrenal, vejiga, páncreas, glándula salival, órganos reproductores masculinos y femeninos (ovario, oviducto y útero en la hembra; y testículo, epidídimo, próstata, vesícula seminal y vaso deferente en el macho), BAT y WAT (subcutáneo, perirrenal), hueso (fémur), piel, mama y músculo esquelético.

Ejemplo 4: Actividad Biológica de Polipéptido TSLPR Murino

La similitud entre el polipéptido TSLPR murino y el receptor de eritropoyetina sugería que el TSLPR murino, como el receptor de eritropoyetina podría activarse por homodimerización. Esto se examinó en un ensayo de proliferación usando una construcción quimérica obtenida a partir de los dominios extracelular y transmembrana del receptor de c-Kit y del dominio citoplasmático del polipéptido TSLPR murino. Para generar esta construcción, se amplificaron por PCR los dominios extracelular y transmembrana de c-Kit y el dominio citoplasmático de TSLPR y se ligaron en el vector retroviral pMX-IRES-GFP usando técnicas convencionales.

Se transfectaron de forma estable células CTLL2 dependientes de IL-2 con construcciones de expresión que codifican c-Kit/TSLPR y c-Kit/β, c-Kit/β y c-Kit/γ o c-Kit/γ en solitario. Las construcciones para c-Kit/β y c-Kit/γ eran como se describe por Nelson *et al.*, 1994, *Nature* 369: 333-36. Después de la transfección, se privó a las células CTLL2 de IL-2, se transfirieron a placas de 48 pocillos a 10.000 células/pocillo y se cultivaron en ausencia o presencia de Factor de Células Madre (SCF), el ligando para c-Kit. Las células se contaron después de 7 días de crecimiento en el cultivo.

La Figura 7 ilustra que cuando IL-2 se reemplazaba por SCF, las células CTLL2 que expresaban de forma estable polipéptido c-Kit/TSLPR quimérico eran incapaces de crecer, sugiriendo que la simple homodimerización del dominio citoplasmático del polipéptido TSLPR murino es insuficiente para inducir una señal proliferativa. Se han obtenido resultados similares en experimentos de proliferación usando un polipéptido c-Kit/γ<sub>c</sub> quimérico (Nelson *et al.*, anteriormente). Además, cuando células CTLL2 se cotransfectaron con c-Kit/TSLPR y c-Kit/β, las células todavía eran incapaces de proliferar. Sin embargo, las células CTLL2 cotransfectadas con c-Kit/β y c-Kit/γ eran capaces de proliferar después de la incubación con SCF. Esto sugería que el dominio citoplasmático de la cadena de IL-2Rβ no podía cooperar con el dominio citoplasmático del polipéptido TSLPR murino para iniciar la proliferación y que el polipéptido TSLPR murino podía oligomerizarse con algún otro receptor para participar en la traducción de señales.

La similitud entre el polipéptido TSLPR murino y γ<sub>c</sub> sugerían que el TSLPR murino puede tener la capacidad de unirse a alguno de los miembros de la subfamilia de citoquinas IL-2. Esto se examinó en un ensayo de marcaje por afinidad usando IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15 marcadas con <sup>125</sup>I. Antes de la adición de una citoquina marcada con <sup>125</sup>I, se reconstituyeron células 293 con las subunidades específicas de citoquinas IL-2Rβ, IL-4Rα o IL-7Rα en presencia de γ<sub>c</sub> o polipéptido TSLPR murino. Ninguno de los ligandos examinados presentaba unión cuando se coexpresaba TSLPR murino con una subunidad específica de citoquina, aun cuando los ligandos se unían eficazmente cuando se coexpresaba γ<sub>c</sub> con una subunidad específica de citoquina. Esto sugería que el polipéptido TSLPR murino se unía a una nueva citoquina o se unía a una citoquina conocida junto con una subunidad nueva o no ensayada.

La linfopoyetina estroma tímica (TLSP) es una citoquina cuyas actividades biológicas solapan con las de IL-7. La actividad de TSLP se identificó originariamente en el medio acondicionado de una línea celular estromal tímica que servía de soporte al desarrollo de células B IgM<sup>+</sup> murinas de células progenitoras hematopoyéticas de hígado fetal (Friend *et al.*, 1994 *Exp. Hematol.* 22: 321-28). Además, TSLP puede promover la linfopoyesis de células B en cultivos de médula ósea a largo plazo y puede coestimular tanto timocitos como células T maduras (Friend *et al.*, anteriormente; Levin *et al.*, 1999, *J. Immunol.* 162: 677-83).

Aunque IL-7 también posee estas actividades (Suda *et al.*, 1989, *Blood* 74: 1936-41; Lee *et al.*, 1989, *J. Immunol.* 142: 3875-83; Sudo *et al.*, 1989, *J. Exp. Med.* 170: 333-38), TSLP es única por el hecho de que promueve la linfopoyesis B hacia la fase de células B inmaduras IgM<sup>+</sup>, mientras que IL-7 facilita principalmente la producción de células pre-B IgM<sup>-</sup> (Levin *et al.*, anteriormente; Candea *et al.*, 1997, *Immunity* 6: 501-08). Una explicación posible para el solapamiento de actividades biológicas de IL-7 y TSLP es que TSLP señaliza a través de un receptor que contiene la cadena de IL-7Rα (Levin *et al.*, anteriormente). Sin embargo, los experimentos de inhibición de anticuerpos han indicado que TSLP no requiere γ<sub>c</sub> para ejercer sus efectos (Levin *et al.*, anteriormente). Estos resultados sugieren que TSLP se uniría al polipéptido TSLPR murino en presencia de IL-7Rα.

La unión de TSLP al polipéptido TSLPR en presencia de IL-7Rα se examinó en ensayos de marcaje por afinidad. Se realizaron ensayos de marcaje por afinidad por adición de 1-5 nM de TSLP marcado con <sup>125</sup>I a 5 x 10<sup>6</sup> células 293 transfectadas con construcciones de expresión para IL-7Rα murino, polipéptido TSLPR murino, IL-7Rα murino y polipéptido TSLPR murino o IL-7Rα humano y polipéptido TSLPR murino. Se preparó TSLP yodada por adición de IODO-GEN (Pierce, Rockford, IL) y <sup>125</sup>I 2 mCi a 1 μg de TSLP. Se obtuvo una actividad específica de aproximadamente 200-300 μCi/μg mediante este método. Antes del marcaje por afinidad, se transfectaron de forma transitoria células 293 usando el método de fosfato de calcio (Eppendorf-5 Prime, Boulder, CO). Después de una incubación de 2 horas con <sup>125</sup>I-TSLP, las células se entrecruzaron con suberato de disuccinimidilo 0,1 mg/ml (Pierce), se lisaron en tampón de lisis y los lisados se resolvieron mediante SDS-PAGE.

Como se muestra en la Figura 8A, <sup>125</sup>I-TSLP se unía al heterodímero de IL-7Rα murino y polipéptido TSLPR murino (carril 4). La banda superior se corresponde con IL-7Rα murino reticulado y la banda inferior se corresponde con polipéptido TSLPR murino reticulado. Además, <sup>125</sup>I-TSLP también se une a heterodímero de IL-7Rα humano y

polipéptido TSLPR murino (carril 5). No se observó unión de TSLP con IL-7R $\alpha$  murino en solitario (carril 2).

También se realizaron ensayos de marcaje por afinidad usando una versión marcada con FLAG del polipéptido TSLPR murino. El polipéptido TSLPR murino-FLAG se obtuvo mediante amplificación por PCR de un fragmento que contenía la región codificante del polipéptido TSLPR usando un cebador 3' que contenía la secuencia correspondiente del epítipo FLAG. Este producto de PCR se subclonó después en PCR3.1 (Invitrogen) y el clon resultante se analizó por secuenciación. Se realizaron ensayos de marcaje por afinidad como se describe en este documento, con la excepción de que los lisados celulares se inmunoprecipitaron con un anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2. Como se muestra en la Figura 8B, después de la inmunoprecipitación de TSLPR, se observó una banda de TSLPR entrecruzado (carril 1), que indicaba que TSLP presenta una unión débil a TSLPR en solitario.

Para examinar si IL-7 murina podía competir por la unión de TSLP en células que expresan polipéptido TSLPR e IL-7R $\alpha$ , se realizaron ensayos de competición. Se analizaron lisados celulares como se describe en este documento, con la excepción de que se añadieron cantidades crecientes de IL-7 murina sin marcar con  $^{125}\text{I}$ -TSLP. Como se muestra en la Figura 8C, un exceso de IL-7 murina inhibía la unión de TSLP al heterodímero de IL-7R $\alpha$ /polipéptido TSLPR. Los ensayos de marcaje por afinidad ilustraban la cooperatividad de IL-7R $\alpha$  y el polipéptido TSLPR murino por la unión a TSLP. Estos ensayos también establecían que IL-7 puede competir por la unión de TSLP, que tiene implicaciones para la competición potencial entre estas dos citoquinas *in vivo*.

La unión de TSLP a células 293 transfectadas con IL-7R $\alpha$  murino y polipéptido TSLPR murino o IL-7R $\alpha$  murino en solitario, se analizó en un ensayo de unión por desplazamiento. Después de dos lavados, se incubaron  $1 \times 10^6$  células 293 transfectadas en una cantidad constante de TSLP marcado con  $^{125}\text{I}$  (aproximadamente 20.000 cpm) y cantidades variables de TSLP sin marcar. Después de una incubación de 3 horas, las células tratadas se separaron del medio por centrifugación en aceite de oliva y N-butilftalato. Se midió la radioactividad ligada a células usando un contador gamma.

Como se muestra en la Figura 9A, se observó unión inespecífica de  $^{125}\text{I}$ -TSLP con células transfectadas con IL-7R $\alpha$  murino en solitario (o vector en solitario), mientras que se observó unión específica de  $^{125}\text{I}$ -TSLP con células transfectadas tanto con IL-7R $\alpha$  como polipéptido TSLPR, con un exceso de TSLP sin marcar compitiendo por la unión de  $^{125}\text{I}$ -TSLP. Las células transfectadas con una polipéptido de TSLPR en solitario presentaban una unión muy baja. El análisis de los datos de unión mediante la transformación de Scatchard se realizó usando el programa informático LIGAND (Munson y Rodbard, 1980, *Anal. Biochem.* 107:220-39). La  $K_d$  para la unión de TSLP a células que expresan polipéptido TSLPR e IL-7R $\alpha$  se determinó que era de aproximadamente 13 nM (Figura 9B). En siete experimentos independientes, se descubrió que la  $K_d$  variaba de 1,2 a 40 nM. Debido a la actividad de unión muy reducida de TSLP por células que expresan polipéptido TSLPR en solitario, no fue posible determinar la  $K_d$  para estas células. También se realizaron ensayos de unión por desplazamiento usando células NAG8/7 que expresan de forma constitutiva receptores de TSLP y proliferan en respuesta a TSLP (Friend, *et al.*, anteriormente; Levin *et al.*, anteriormente). En estos ensayos de unión por desplazamiento, se incubaron  $5 \times 10^6$  células NAG8/7 en una cantidad constante de TSLP marcado con  $^{125}\text{I}$  (aproximadamente 180.000 cpm) y cantidades variables de TSLP sin marcar. El resto del ensayo se realizó como se describe en este documento. Como se muestra en la Figura 9C, la transformación de Scatchard de los datos de unión obtenidos usando células NAG8/7 sugería que las células expresaban una sola clase de receptores que tenían una  $K_d$  de aproximadamente 2,2 nM - resultados que son similares a los obtenidos usando las células 293 transfectadas.

También se realizaron ensayos de unión por desplazamiento para comparar el desplazamiento de TSLP marcado con  $^{125}\text{I}$  por IL-7 o TSLP sin marcar en células 293 transfectadas con polipéptido TSLPR e IL-7R $\alpha$ . La Figura 9D ilustra que la IL-7 murina compite por la unión al polipéptido TSLPR.

Se ha demostrado anteriormente que el tratamiento de células NAG8/7 con IL-7 o TSLP activa STAT5. El papel posible del polipéptido TSLPR en la activación de STAT5 se analizó en ensayos de CAT usando células HepG2. Se introdujeron construcciones de expresión para IL-7R $\alpha$  y TSLPR, o IL-7R $\alpha$  y  $\gamma_c$ , en células HepG2 con el vector pHRRE-CAT mediante transfección con fosfato de calcio. El vector pHRRE-CAT contiene ocho copias en tándem del elemento de respuesta al receptor de hematopoyetina inducible por citoquinas de 27 pb y STAT5b (Ziegler *et al.*, 1995, *Eur. J. Immunol.* 25:399-404). Se permitió que las células transfectadas se recuperaran durante una noche, después de lo cual las células de trataron con tripsina y se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos. Se dejó que las células se adherieran a las placas durante una incubación de 24 horas y después las células se incubaron en medio sin suero que contenía 100 ng/ml de IL-7 o TSLP, durante 24 horas adicionales.

La actividad de CAT y la estimulación en veces después de normalizar por las eficacias de transfección se muestran en la Figura 10. No se observó aumento en la actividad de CAT después de la estimulación con TSLP en presencia de IL-7R $\alpha$  en solitario (carril 2) o con IL-7R $\alpha$  y  $\gamma_c$  (carril 7). Sin embargo, si se cotransfectaba polipéptido TSLPR, se observaba un aumento drástico en la actividad de CAT después de la estimulación con TSLP (carril 5). Esto demuestra que la presencia de polipéptido TSLPR es necesaria para la señalización de TSLP. Aunque la cotransfección de  $\gamma_c$  e IL-7R $\alpha$  no tenía efectos sobre la actividad indicadora dependiente de TSLP, esta combinación mediaba eficazmente la activación del indicador dependiente de IL-7 (carril 9).

- Más de una citoquina comparte varias cadenas del receptor de citoquinas. Los ejemplos mejor conocidos son gp130, que comparten IL-6, IL-11 y el factor neurotrópico filiar, factor inhibidor de leucemia, oncostatina M y cardiotropina-1 (Hirano *et al.*, 1997, *Cytokine Growth Factor Rev.* 8: 241-52; Taga y Kishimoto, 1997, *Annu. Rev. Immunol.* 15:797-819),  $\beta_c$ , que comparten IL-3, IL-5 y GM-CSF (Miyajima *et al.*, 1997, *Leukemia* 11: 418-22; Guthridge *et al.*, 1998, *Stem Cells* 16: 301-13; Burdach *et al.*, 1998, *Curr. Opin. Hematol.* 5: 177-80), y  $\gamma_c$ , que comparten IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15 (Noguchi *et al.*, 1993, *Science* 262: 1877-80; Kondo *et al.*, 1994, anteriormente; Kondo *et al.*, 1993, anteriormente; Russell *et al.*, 1994, anteriormente; Takeshita *et al.*, anteriormente; Russell *et al.*, 1993, anteriormente; Giri *et al.*, anteriormente; Kimura *et al.*, anteriormente). La lista de cadenas de receptores de citoquinas que sirven como componente de más de un receptor de citoquinas incluye IL-2R $\beta$ , que es un componente tanto de los receptores de IL-2 como de IL-15, e IL-4R $\alpha$ , que es un componente de los receptores tanto de IL-4 como de IL-13. La subunidad del receptor de citoquinas IL-7R $\alpha$  puede añadirse ahora a esta lista ya que los datos presentados en este documento demuestran que esta subunidad es un componente tanto de los receptores de IL-7 como de TSLP.
- La observación de defectos en el desarrollo de células T y células B en ratones *I17<sup>-/-</sup>* (von Freeden-Jeffrey *et al.*, 1995, *J. Exp. Med.* 181: 1519-26) sugiere que TSLP no puede compensar completamente la pérdida de IL-7. Un examen de la cooperación funcional de IL-7R $\alpha$  en la señalización de TSLP puede ayudar a explicar las diferencias en el desarrollo de células B en ratones *I17r<sup>-/-</sup>* e *I17<sup>-/-</sup>* (Candeias *et al.*, 1997, *Immunity* 6: 501-08; vonFreeden-Jeffrey *et al.*, anteriormente; Peschon *et al.*, 1994, *J. Exp. Med.* 180: 1955-60; He *et al.*, 1997, *J. Immunol.* 158: 2592-99). La caracterización adicional del polipéptido TSLPR ayudará a esta investigación.

#### Ejemplo 5: Producción de polipéptidos TSLPR

##### A. Expresión de polipéptidos de TSLPR en bacterias

Se usó PCR para amplificar secuencias de ADN molde que codifican un polipéptido TSLPR usando cebadores que se corresponden con los extremos 5' y 3' de la secuencia. Los productos de ADN amplificados pueden modificarse para contener sitios de enzimas de restricción para permitir la inserción en vectores de expresión. Los productos de PCR se purifican en gel y se insertan en vectores de expresión usando metodología de ADN recombinante convencional. Un vector ejemplar, tal como pAMG21 (ATCC N° 98113) que contiene el promotor lux y un gen que codifica resistencia a kanamicina se digiere con Bam HI y Nde I para la clonación direccional del ADN insertado. La mezcla ligada se transforma en una cepa hospedadora de *E. coli* por electroporación y los transformantes se seleccionan por resistencia a kanamicina. El ADN plasmídico de las colonias seleccionadas se aísla y se somete a secuenciación de ADN para confirmar la presencia del inserto.

Se incuban células hospedadoras transformadas en medio 2xYT que contiene kanamicina 30  $\mu$ g/ml a 30°C antes de la inducción. Se induce la expresión génica mediante la adición de N-(3-oxohexanoil)-dl-homoserina lactona a una concentración final de 30 ng/ml seguida de la incubación a 30°C o 37°C durante seis horas. La expresión de polipéptido TSLPR se evalúa mediante la centrifugación del cultivo, la resuspensión y la lisis de los sedimentos bacterianos y el análisis de proteínas de célula hospedadora mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

Se purifican cuerpos de inclusión que contienen polipéptido TSLPR de la forma siguiente. Las células bacterianas se sedimentan por centrifugación y se resuspenden en agua. La suspensión celular se lisa por sonicación y se sedimenta por centrifugación a 195.000 x g de 5 a 10 minutos. El sobrenadante se desecha y el sedimento se lava y se transfiere a un homogeneizador. El sedimento se homogeneiza en 5 ml de una solución de Percoll (Percoll líquido al 75% y NaCl 0,15 M) hasta que se suspende uniformemente y después se diluye y se centrifuga a 21.600 x g durante 30 minutos. Las fracciones de gradiente que contienen los cuerpos de inclusión se recuperan y se combinan. Los cuerpos de inclusión aislados se analizan mediante SDS-PAGE.

Una sola banda en un gel de SDS-poliacrilamida que se corresponde con el polipéptido TSLPR producido por *E. coli* se escinde del gel y la secuencia de aminoácidos N-terminal se determina esencialmente como se describe por Matsudaira *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 10-35.

##### B. Expresión de polipéptido TSLPR en células de mamífero

Se usa PCR para amplificar secuencias de ADN molde que codifican un polipéptido de TSLPR usando cebadores que se corresponden con los extremos 5' y 3' de la secuencia. Los productos de ADN amplificados pueden modificarse para contener sitios de enzimas de restricción para permitir la inserción en vectores de expresión. Los productos de PCR se purifican en gel y se insertan en vectores de expresión usando metodología de ADN recombinante convencional. Un vector de expresión ejemplar, pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), que contiene un origen de replicación de virus Epstein-Barr puede usarse para la expresión de polipéptidos TSLPR en células 293-EBNA-1. Los productos de PCR amplificados y purificados en gel se ligan en vector pCEP4 y se introducen células 293-EBNA por lipofección. Las células transfectadas se seleccionan en higromicina 100  $\mu$ g/ml y los cultivos resistentes a fármaco resultantes se cultivan hasta la confluencia. Después, las células se cultivan en medio sin suero durante 72 horas. Los medios acondicionados se retiran y se analiza la expresión de polipéptido TSLPR

mediante SDS-PAGE.

La expresión de polipéptido TSLPR puede detectarse mediante tinción de plata. Como alternativa, se produce polipéptido de TSLPR como una proteína de fusión con un marcador de epítipo tal como un dominio constante de IgG o un epítipo FLAG que puede detectarse mediante análisis de transferencia de Western usando anticuerpos contra el marcador peptídico.

Los polipéptidos TSLPR pueden escindirse de un gel de SDS-poliacrilamida o las proteínas de fusión de TSLPR se purifican mediante cromatografía de afinidad para el marcador de epítipo y se someten a análisis de secuencia de aminoácidos N-terminal como se describe en este documento.

### C. Expresión y purificación de polipéptido TSLPR en células de mamífero

Se introducen construcciones de expresión de polipéptido TSLPR en células 293 EBNA o CHO usando un protocolo de lipofección o de fosfato de calcio.

Para realizar estudios funcionales sobre los polipéptidos TSLPR que se producen, se generan grandes cantidades de medios acondicionados a partir de una combinación de clones de 293 EBNA seleccionados con higromicina. Las células se cultivan en matraces Nunc Triple Flasks de 500 cm hasta una confluencia del 80% antes de cambiarlas a medio sin suero una semana antes de recoger los medios. Se recogen los medios acondicionados y se congelan a -20°C hasta la purificación.

Los medios acondicionados se purifican mediante cromatografía de afinidad como se describe a continuación. Los medios se descongelan y después se pasan a través de un filtro de 0,2 µm. Una columna de Proteína G se equilibra con PBS a pH 7,0 y después se carga con los medios filtrados. La columna se lava con PBS hasta que la absorbancia a A<sub>280</sub> alcanza las medidas basales. El polipéptido TSLPR se eluye de la columna con glicina-HCl 0,1 M a pH 2,7 e inmediatamente se neutraliza con Tris-HCl 1M a pH 8,5. Las fracciones que contienen polipéptido TSLPR se combinan, se dializan en PBS y se almacenan a -70°C.

Para la escisión del Factor Xa del polipéptido de fusión de polipéptido TSLPR humano-Fc la proteína purificada por cromatografía de afinidad se dializa en Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM a pH 8,0. La proteasa de restricción Factor Xa se añade a la proteína dializada a 1/100 (p/p) y la muestra se digiere durante una noche a temperatura ambiente.

#### Ejemplo 6: Producción de anticuerpos anti-polipéptido TSLPR

Pueden obtenerse anticuerpos contra polipéptidos TSLPR por inmunización con proteína purificada o con péptidos TSLPR producidos mediante síntesis biológica o química. Los procedimientos adecuados para generar anticuerpos incluyen los descritos en Hudson y Bay, *Practical Immunology* (2ª ed., Blackwell Scientific Publications).

En un procedimiento para la producción de anticuerpos, se inyecta un antígeno TSLPR (tal como un polipéptido TSLPR) a animales (típicamente ratones o conejos), y los que tienen niveles de títulos en suero suficientes determinados mediante ELISA se seleccionan para producción de hibridomas. Se estiran bazos de animales inmunizados y se preparan como suspensiones de una sola célula de las que se recuperan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan con células de mieloma de ratón (tales como células Sp2/0-Ag14), se incuban primero en DMEM con penicilina 200 U/ml, sulfato de estreptomycin 200 µg/m y glutamina 4 mM y después se incuban en medio de selección con HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina). Después de la selección, se toman los sobrenadantes de cultivo de tejidos de cada pocillo de fusión y se ensayan para producción de anticuerpos anti-TSLPR mediante ELISA.

También pueden emplearse procedimientos alternativos para obtener anticuerpos anti-TSLPR tales como la inmunización de ratones transgénicos que llevan loci de Ig humana para la producción de anticuerpos humanos y la exploración de bibliotecas de anticuerpos sintéticos, tales como los generados por mutagénesis de un dominio variable de anticuerpo.

#### Ejemplo 7: Expresión de polipéptido TSLPR en ratones transgénicos

Para evaluar la actividad biológica del polipéptido TSLPR, se prepara una construcción que codifica una proteína de fusión de polipéptido TSLPR /Fc bajo el control de un promotor ApoE específico de hígado. La administración de esta construcción se esperaba que cause cambios patológicos que sean informativos en lo que se refiere a la función del polipéptido de TSLPR. De forma similar, se prepara una construcción que contiene el polipéptido TSLPR de longitud completa bajo el control del promotor de beta actina. La administración de esta construcción se espera que dé como resultado una expresión ubicua.

Para generar estas construcciones, se usa PCR para amplificar secuencias de ADN molde que codifican un polipéptido de TSLPR usando cebadores que se corresponden con los extremos 5' y 3' de la secuencia deseada y

que incorporan sitios de enzimas de restricción para permitir la inserción del producto amplificado en un vector de expresión. Después de la amplificación, los productos de PCR se purifican en gel, se digieren con las enzimas de restricción apropiadas y se ligan en un vector de expresión usando técnicas de ADN recombinante convencionales. Por ejemplo, pueden clonarse secuencias de polipéptido TSLPR amplificadas en un vector de expresión bajo el control del promotor de  $\beta$ -actina humano como se describe por Graham *et al.*, 1997, *Nature Genetics*. 17: 272-74 y Ray *et al.*, 1991, *Genes Dev*. 5: 2265-73.

Después de la ligación, se usan mezclas de reacción para transformar una cepa hospedadora de *E. coli* por electroporación y se seleccionan los transformantes por la resistencia a fármaco. El ADN plasmídico de las colonias seleccionadas se aísla y se somete a secuenciación de ADN para confirmar la presencia de un inserto apropiado y la ausencia de mutaciones. El vector de expresión de polipéptido TSLPR se purifica a través de dos rondas de centrifugación en gradiente de densidad de CsCl, se escinde con una enzima de restricción adecuada y el fragmento linealizado que contiene el transgén del polipéptido TSLPR se purifica mediante electroforesis en gel. El fragmento purificado se resuspende en Tris 5 mM, pH 7,4 y EDTA 0,2 mM a una concentración de 2 mg/ml.

Se inyectan embriones de una sola célula de ratones criados BDF1 x BDF1 como se describe (Publicación PCT N° WO 97/23614). Se cultivaron embriones durante una noche en un incubador de CO<sub>2</sub> y se transfirieron 15-20 embriones de dos células a los oviductos de una ratona hembra CD1 pseudogestante. La descendencia obtenida a partir de la implantación de embriones microinyectados se exploró por amplificación por PCR del transgén integrado en muestras de ADN genómico de la forma siguiente. Se digirieron fragmentos de oreja en 20 ml de tampón de oreja (Tris 20 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM, SDS al 0,5% y proteinasa K 500 mg/ml) a 55°C durante una noche. Después la mezcla se diluyó con 200 ml de TE y se usaron 2 ml de la muestra de oreja en una reacción de PCR usando cebadores apropiados.

A las 8 semanas de edad, se sacrificaron los animales transgénicos fundadores y los animales de control para la necropsia y el análisis patológico. Se extirparon porciones de bazo y se aisló el ARN celular total de los bazos usando el kit de extracción de ARN total (Qiagen) y se determinó la expresión del transgén mediante RT-PCR. El ARN recuperado de los bazos se convirtió en ADNc usando el sistema de preamplificación SuperScript™ (Gibco-BRL) de la forma siguiente. Un cebador adecuado, localizado en la secuencia del vector de expresión y 3' al transgén del polipéptido TSLPR se usó para cebar la síntesis de ADNc a partir de los transcritos del transgén. Se incubaron diez mg de ARN de bazo total de transgénicos fundadores y controles con 1 mM de cebador durante 10 minutos a 70°C y se colocó en hielo. La reacción se suplementó después con Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 10 mM de cada dNTP, DTT 0,1 mM, y 200 U de transcriptasa inversa SuperScript II. Después de la incubación durante 50 minutos a 42°C, la reacción se interrumpió por calentamiento durante 15 minutos a 72°C y se digirió con 2U de ARNasa H durante 20 minutos a 37°C. Después, las muestras se amplificaron por PCR usando cebadores específicos para el polipéptido TSLPR.

La determinación de los fenotipos de ratones *Tslp*<sup>-/-</sup> o *Tslpr*<sup>-/-</sup> también ayudará a definir el papel exacto de TSLP.

#### Ejemplo 8: Actividad biológica de polipéptido TSLPR en ratones transgénicos

Antes de la eutanasia, los animales transgénicos se pesaron, se anestesiaron con isoflurano y se extrajo sangre por punción cardiaca. Las muestras se sometieron a hematología y análisis químico del suero. Se realizó una radiografía después de la exsanguinación a muerte. Tras una disección macroscópica, los órganos viscerales principales se sometieron análisis del peso.

Después de una disección macroscópica, se extirparon tejidos (es decir, hígado, bazo, páncreas, estómago, el tracto gastrointestinal completo, riñón, órgano reproductores, piel y glándulas mamarias, hueso, cerebro, corazón, pulmón, timo, traquea, esófago, glándula tiroidea, glándulas adrenales, vejiga urinaria, ganglios linfáticos y músculo esquelético) y se fijaron en Zn-formalina tamponada al 10% para examen histológico. Después de la fijación, los tejidos se procesaron en bloques de parafina y se obtuvieron secciones de 3 mm. Todas las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina y después se sometieron a análisis histológico.

El bazo, los ganglios linfáticos y la placas de Peyer tanto de los ratones transgénicos como de control se sometieron a análisis inmunohistológico con anticuerpos específicos de células B y de células T de la forma siguiente. Las secciones embebidas en parafina fijadas con formalina se desparafinaron y se hidrataron con agua desionizada. Las secciones se inactivaron con peróxido de hidrógeno al 3%, se bloquearon con Protein Block (Lipshaw, Pittsburgh, PA), y se incubaron en anticuerpo monoclonal de rata anti-ratón B220 y CD3 (Harlan, Indianapolis, IN). La unión de anticuerpo se detecta mediante inmunoglobulinas de conejo anti-rata biotiniladas y estreptavidina conjugada con peroxidasa (BioGenex, San Ramon, CA) con DAB como cromógeno (BioTek, Santa Barbara, CA). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina.

Después de la necropsia, se extirparon MLN y secciones de bazo y timo de animales transgénicos y hermanos de camada de control. Se prepararon suspensiones de una sola célula triturando suavemente los tejidos con el extremo romo de una jeringa contra el fondo de un tamiz de células de nylon de 100 mm (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Las células se lavaron dos veces, se contaron y después se incubaron aproximadamente  $1 \times 10^6$  células de

5 cada tejido durante 10 minutos con bloque CD16/32 (FcγIII/II) Fc 0,5 µg en volumen de 20 µl. Después las muestras se tiñeron durante 30 minutos a 2-8°C en un volumen de 100 µl de PBS (que carecía de Ca<sup>+</sup> y Mg<sup>+</sup>) albúmina de suero bovino al 0,1% y azida sódica al 0,01% con anticuerpo 0,5 µg de anticuerpos monoclonales conjugados con FITC o PE contra CD90.2 (Thy-1.2), CD45R (B220), CD11b (Mac-1), Gr-1, CD4 o CD8 (PharMingen, San Diego, CA). Después de la unión de anticuerpo, las células se lavaron y después se analizaron mediante citometría de flujo en un FACScan (Becton Dickinson).

Se describen los siguientes puntos

- 10 (1.) Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
- 15 (a) la secuencia de nucleótidos como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 11;
- (b) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8;
- 20 (c) una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones moderadamente o altamente rigurosas con la complementaria de cualquiera de (b) o (c); y
- (d) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de (b) o (c).
- 25 (2.) Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 70 por ciento con el polipéptido como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8;
- 30 (b) una secuencia de nucleótidos que codifica una variante alélica o variante de corte y empalme de la secuencia de nucleótidos como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 11, o (a);
- 35 (c) una región de la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 11, (a) o (b), que codifica un fragmento polipeptídico de al menos aproximadamente 25 restos aminoacídicos, en la que el fragmento polipeptídico tiene una actividad del polipéptido codificado como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8, o es antigénico;
- 40 (d) una región de la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 10 o SEC ID N°: 11, o cualquiera de (a)-(c), que comprende un fragmento de al menos aproximadamente 16 nucleótidos;
- 45 (e) una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones moderadamente o altamente rigurosas con la complementaria de cualquiera de (a)-(d); y
- (f) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de (a)-(d).
- 50 (3.) Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 con al menos una sustitución de aminoácido conservativa, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8;
- 55 (b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 con al menos una inserción de aminoácido, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8;
- 60 (c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 con al menos una delección de aminoácido, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8;
- 65 (d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 que tiene un truncamiento C- y/o N-terminal, en la que el polipéptido codificado tiene una

actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8;

5 (e) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 con al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en sustituciones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, deleciones de aminoácidos, truncamiento C-terminal y N-terminal, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8;

10 (f) una secuencia de nucleótidos de cualquiera de (a)-(e), que comprende un fragmento de al menos aproximadamente 16 nucleótidos;

(g) una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones moderadamente o altamente rigurosas con la complementaria de cualquiera de (a)-(f); y

15 (h) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de (a)-(e).

(4.) Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 1, 2 ó 3.

20 (5.) Una célula hospedadora que comprende el vector del punto 4.

(6.) La célula hospedadora del punto 5 que es una célula eucariota.

(7.) La célula hospedadora del punto 5 que es una célula procariota.

25 (8.) Un proceso de producción de un polipéptido TSLPR que comprende cultivar la célula hospedadora del punto 5 en condiciones adecuadas para expresar el polipéptido y, opcionalmente, aislar el polipéptido del cultivo.

(9.) Un polipéptido producido por el proceso del punto 8.

30 (10.) El proceso del punto 8, en el que la molécula de ácido nucleico comprende un ADN promotor distinto del ADN promotor para el polipéptido TSLPR nativo unido operativamente al ADN que codifica el polipéptido TSLPR.

35 (11.) La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con el punto 2, en la que el porcentaje de identidad se determina usando un programa informático seleccionado del grupo que consiste en GAP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit y el algoritmo de Smith Waterman.

40 (12.) Un proceso para determinar si un compuesto inhibe la actividad de polipéptido TSLPR o la producción de polipéptido TSLPR, que comprende exponer una célula de acuerdo con cualquiera de los puntos 5, 6 ó 7 al compuesto, y medir la actividad de polipéptido TSLPR o la producción de polipéptido TSLPR en dicha célula.

(13.) Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8.

45 (14.) Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 6 o SEC ID N°: 9, que comprende opcionalmente además una metionina amino-terminal;

50 (b) una secuencia de aminoácidos para un ortólogo de cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8;

(c) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 70 por ciento con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8;

55 (d) un fragmento de la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEC ID N°: 5 or SEC ID N°: 8, que comprende al menos aproximadamente 25 restos aminoacídicos, en el que el fragmento tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8, o es antigénico; y

60 (e) una secuencia de aminoácidos para una variante alélica o variante de corte y empalme de la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8, o cualquiera de (a)-(c).

(15.) Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

65 (a) la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 con al

- menos una sustitución de aminoácido conservativa, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8;
- 5 (b) la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 con al menos una inserción de aminoácido, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8;
- 10 (c) la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 con al menos una deleción de aminoácido, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8;
- (d) la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8, que tiene un truncamiento C- y/o N-terminal, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8; y
- 15 (e) la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8 con al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en sustituciones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, deleciones de aminoácidos, truncamiento C-terminal y N-terminal, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8.
- 20 (16.) Un polipéptido aislado codificado por la molécula de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 1,2 ó 3, en el que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido expuesto en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8.
- 25 (17.) El polipéptido aislado de acuerdo con el punto 14, en el que el porcentaje de identidad se determina usando un programa informático seleccionado del grupo que consiste en GAP, BLASTP, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit y el algoritmo de Smith-Waterman.
- (18.) Un agente de unión selectiva o fragmento del mismo que se une específicamente al polipéptido de cualquiera de los puntos 13,14 ó 15.
- 30 (19.) El agente de unión selectiva o fragmento del mismo del punto 18, que se une específicamente al polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8, o un fragmento del mismo.
- 35 (20.) El agente de unión selectiva del punto 18 que es un anticuerpo o fragmento del mismo.
- (21.) El agente de unión selectiva del punto 18 que es un anticuerpo humanizado.
- (22.) El agente de unión selectiva del punto 18 que es un anticuerpo humano o fragmento del mismo.
- 40 (23.) El agente de unión selectiva del punto 18 que es un anticuerpo policlonal o fragmento del mismo.
- (24.) El agente de unión selectiva del punto 18 que es un anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo.
- 45 (25.) El agente de unión selectiva del punto 18 que es un anticuerpo quimérico o fragmento del mismo.
- (26.) El agente de unión selectiva del punto 18 que es un anticuerpo injertado en CDR o fragmento del mismo.
- 50 (27.) El agente de unión selectiva del punto 18 que es un anticuerpo antiidiotípico o fragmento del mismo.
- (28.) El agente de unión selectiva del punto 18 que es un fragmento de región variable.
- (29.) El fragmento de región variable del punto 28 que es un fragmento Fab o Fab'.
- 55 (30.) Un agente de unión selectiva o fragmento del mismo que comprende al menos una región determinante de complementariedad con especificidad por un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8.
- (31.) El agente de unión selectiva del punto 18 que está unido a un marcador detectable.
- 60 (32.) El agente de unión selectiva del punto 18 que antagoniza la actividad biológica del polipéptido TSLPR.
- (33.) Un método para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad, afección o trastorno relacionado con polipéptido TSLPR, que comprende administrar a un paciente una cantidad eficaz de un agente de unión selectiva de acuerdo con el punto 18.
- 65

- (34.) Un agente de unión selectiva producido por inmunización de un animal con un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID N°: 5 o SEC ID N°: 8.
- 5 (35.) Un hibridoma que produce un agente de unión selectiva capaz de unirse a un polipéptido de acuerdo con cualquiera de los puntos 1,2 ó 3.
- (36.) Un método de detección o cuantificación de la cantidad de polipéptido TSLPR usando el anticuerpo o fragmento anti-TSLPR del punto 18.
- 10 (37.) Una composición que comprende el polipéptido de cualquiera de los puntos 13,14 ó 15, y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable.
- (38.) La composición del punto 37, en la que el agente de formulación farmacéuticamente aceptable es un vehículo, adyuvante, solubilizante, estabilizante o antioxidante.
- 15 (39.) La composición del punto 37, en la que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEC ID N°: 6 o SEC ID N°: 9.
- (40.) Un polipéptido que comprende un derivado del polipéptido de cualquiera de los puntos 13,14 ó 15.
- 20 (41.) El polipéptido del punto 40, que está modificado covalentemente con un polímero soluble en agua.
- (42.) El polipéptido del punto 41, en el que el polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, monometoxipolietilenglicol, dextrano, celulosa, poli-(N-vinil-pirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados y alcohol polivinílico.
- 25 (43.) Una composición que comprende una molécula de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 1,2 ó 3 y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable.
- 30 (44.) La composición del punto 43, en la que dicha molécula de ácido nucleico está contenida en un vector viral.
- (45.) Un vector viral que comprende una molécula de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 1, 2 ó 3.
- 35 (46.) Un polipéptido de fusión que comprende el polipéptido de cualquiera de los puntos 13, 14 ó 15 fusionado a una secuencia de aminoácidos heteróloga.
- (47.) El polipéptido de fusión del punto 46, en el que la secuencia de aminoácidos heteróloga es un dominio constante de IgG o un fragmento del mismo.
- 40 (48.) Un método para tratar, prevenir o mejorar una afección médica que comprende administrar a un paciente el polipéptido de cualquiera de los puntos 13,14 ó 15, o el polipéptido codificado por el ácido nucleico de cualquiera de los puntos 1, 2 ó 3.
- 45 (49.) Un método de diagnóstico de una afección patológica o de una susceptibilidad a una afección patológica en un sujeto, que comprende:
- 50 (a) determinar la presencia o la cantidad de expresión del polipéptido de cualquiera de los puntos 13,14 ó 15, o del polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 1, 2 ó 3 en una muestra; y
- (b) diagnosticar una afección patológica o una susceptibilidad a una afección patológica basándose en la presencia o la cantidad de expresión del polipéptido.
- 55 (50.) Un dispositivo que comprende:
- (a) una membrana adecuada para implantación; y
- 60 (b) células encapsuladas dentro de dicha membrana, en la que dichas células secretan una proteína de cualquiera de los puntos 13,14 ó 15; y dicha membrana es permeable a dicha proteína e impermeable a materiales perjudiciales para dichas células.
- (51.) Un método de identificación de un compuesto que se une a un polipéptido TSLPR, que comprende:
- 65 (a) poner en contacto el polipéptido de cualquiera de los puntos 13,14 ó 15 con un compuesto; y

(b) determinar el grado de unión del polipéptido TSLPR al compuesto.

(52.) El método del punto 51, que comprende además determinar la actividad del polipéptido cuando está unido al compuesto.

5 (53.) Un método de modulación de los niveles de un polipéptido en un animal que comprende administrar al animal la molécula de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 1, 2 ó 3.

10 (54.) Un mamífero transgénico no humano que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 1, 2 ó 3.

(55.) Un proceso para determinar si un compuesto inhibe la actividad de polipéptido TSLPR o la producción de polipéptido TSLPR, que comprende exponer un mamífero transgénico de acuerdo con el punto 54 al compuesto, y medir la actividad de polipéptido TSLPR o la producción de polipéptido TSLPR en dicho mamífero.

15 (56.) Una molécula de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 1, 2 ó 3 unida a un soporte sólido.

(57.) Una matriz de moléculas de ácido nucleico que comprende al menos una molécula de ácido nucleico de cualquiera de los puntos 1, 2 ó 3.

20 Lista de secuencias

<110> Saris, Chris  
Chang, Ming-Shi

25 <120> Moléculas de receptor de linfopoyetina estromal tímica y usos de las mismas

<130> 00-514-C

30 <140>  
<141>

<150> 60/214.866  
<151> 28-06-2000

35 <160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.0

40 <210> 1  
<211> 1409  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

45 <220>  
<221> CDS  
<222> (162)..(1274)

50 <220>  
<221> sig\_peptide  
<222> (162)..(213)

<220>  
<221> misc\_feature  
55 <222> (891)..(953)  
<223> Secuencia codificante del dominio transmembrana predicho

<400> 1

ES 2 391 124 T3

```

cccccttctc gccgacccct gaccccgccc cgccccgccc acccaggggc ccagacctga 60
gcggcggcca ggtcgcgggt gacgtcacag ggccgttgcc ccatccgtcc cgtggcctgg 120
acggacagag ctgaggcagg ggaataaccg cgagtgtctga g atg gca tgg gca ctc 176
                                         Met Ala Trp Ala Leu
                                         1           5

gcg gtc atc ctc ctg cct cgg ctc ctt gcg gcg gca gcg gcg gcg gcg 224
Ala Val Ile Leu Leu Pro Arg Leu Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
                10                15                20

gcg gtg acg tca cgg ggt gat gtc aca gtc gtc tgc cat gac ctg gag 272
Ala Val Thr Ser Arg Gly Asp Val Thr Val Val Cys His Asp Leu Glu
                25                30                35

acg gtg gag gtc acg tgg ggc tcg ggc ccc gac cac cac agc gcc aac 320
Thr Val Glu Val Thr Trp Gly Ser Gly Pro Asp His His Ser Ala Asn

```

ES 2 391 124 T3

	40		45		50												
ttg agc ctg gag ttc cgt tat ggt act ggc gcc ctg caa ccc tgc ccg																	368
Leu Ser Leu Glu Phe Arg Tyr Gly Thr Gly Ala Leu Gln Pro Cys Pro																	
	55						60					65					
cga tat ttc ctg tcc ggc gct ggt gtc act tcc ggg tgc atc ctc ccc																	416
Arg Tyr Phe Leu Ser Gly Ala Gly Val Thr Ser Gly Cys Ile Leu Pro																	
	70					75				80							85
gcg gcg agg gcg ggg ctg ctg gag ctg gca ctg cgc gac gga ggc ggg																	464
Ala Ala Arg Ala Gly Leu Leu Glu Leu Ala Leu Arg Asp Gly Gly Gly																	
				90					95								100
gcc atg gtg ttt aag gct agg cag cgc gcg tcc gcc tgg ctg aag ccc																	512
Ala Met Val Phe Lys Ala Arg Gln Arg Ala Ser Ala Trp Leu Lys Pro																	
				105					110								115
cgc cca cct tgg aat gtg acg ctg ctc tgg aca cca gac ggg gac gtg																	560
Arg Pro Pro Trp Asn Val Thr Leu Leu Trp Thr Pro Asp Gly Asp Val																	
			120					125									130
act gtc tcc tgg cct gcc cac tcc tac ctg ggc ctg gac tac gag gtg																	608
Thr Val Ser Trp Pro Ala His Ser Tyr Leu Gly Leu Asp Tyr Glu Val																	
	135						140										145
cag cac cgg gag agc aat gac gat gag gac gcc tgg cag acg acc tca																	656
Gln His Arg Glu Ser Asn Asp Asp Glu Asp Ala Trp Gln Thr Thr Ser																	
	150					155				160							165
ggg ccc tgc tgt gac ttg aca gtg ggc ggg ctc gac ccc gcg cgc tgc																	704
Gly Pro Cys Cys Asp Leu Thr Val Gly Gly Leu Asp Pro Ala Arg Cys																	
				170					175								180
tat gac ttc cgg gtt cgg gcg tcg ccc cgg gcc gcg cac tat ggc ctg																	752
Tyr Asp Phe Arg Val Arg Ala Ser Pro Arg Ala Ala His Tyr Gly Leu																	
			185					190									195
gag gcg cag cct agc gag tgg aca gcg gtg aca agg ctt tcc ggg gca																	800
Glu Ala Gln Pro Ser Glu Trp Thr Ala Val Thr Arg Leu Ser Gly Ala																	
			200				205										210
gca tcc gcg ggt gac ccc tgc gcc gcc cac ctt ccc ccc cta gcc tcc																	848
Ala Ser Ala Gly Asp Pro Cys Ala Ala His Leu Pro Pro Leu Ala Ser																	
	215					220											225
tgt acc gca agc ccc gcc cca tcc ccg gcc ctg gcc ccg ccc ctc ctg																	896
Cys Thr Ala Ser Pro Ala Pro Ser Pro Ala Leu Ala Pro Pro Leu Leu																	
	230					235				240							245
ccc ctg ggc tgc ggc cta gca gcg ctg ctg aca ctg tcc ctg ctc ctg																	944
Pro Leu Gly Cys Gly Leu Ala Ala Leu Leu Thr Leu Ser Leu Leu Leu																	
				250					255								260
gcc gcc ctg agg ctt cgc agg gtg aaa gat gcg ctg ctg ccc tgc gtc																	992
Ala Ala Leu Arg Leu Arg Arg Val Lys Asp Ala Leu Leu Pro Cys Val																	
			265					270									275



ES 2 391 124 T3

			100						105					110			
Ala	Trp	Leu	Lys	Pro	Arg	Pro	Pro	Trp	Asn	Val	Thr	Leu	Leu	Trp	Thr		
		115					120					125					
Pro	Asp	Gly	Asp	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Pro	Ala	His	Ser	Tyr	Leu	Gly		
	130					135					140						
Leu	Asp	Tyr	Glu	Val	Gln	His	Arg	Glu	Ser	Asn	Asp	Asp	Glu	Asp	Ala		
145					150					155					160		
Trp	Gln	Thr	Thr	Ser	Gly	Pro	Cys	Cys	Asp	Leu	Thr	Val	Gly	Gly	Leu		
				165					170					175			
Asp	Pro	Ala	Arg	Cys	Tyr	Asp	Phe	Arg	Val	Arg	Ala	Ser	Pro	Arg	Ala		
			180					185					190				
Ala	His	Tyr	Gly	Leu	Glu	Ala	Gln	Pro	Ser	Glu	Trp	Thr	Ala	Val	Thr		
		195					200					205					
Arg	Leu	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Gly	Asp	Pro	Cys	Ala	Ala	His	Leu		
	210					215					220						
Pro	Pro	Leu	Ala	Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Pro	Ala	Pro	Ser	Pro	Ala	Leu		
225					230					235					240		
Ala	Pro	Pro	Leu	Leu	Pro	Leu	Gly	Cys	Gly	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Thr		
				245					250					255			
Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Val	Lys	Asp	Ala		
			260					265					270				
Leu	Leu	Pro	Cys	Val	Pro	Asp	Pro	Ser	Gly	Ser	Phe	Pro	Gly	Leu	Phe		
		275					280					285					
Glu	Lys	His	His	Gly	Asn	Phe	Gln	Ala	Trp	Ile	Ala	Asp	Ala	Gln	Ala		
	290					295					300						
Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	Arg	Thr	Glu	Glu	Glu	Asp	Asp	Leu	Ile	His	Pro		
305					310					315					320		
Lys	Ala	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Glu	Asp	Gly	Thr	Ser	Leu	Cys	Thr	Val		
				325					330					335			
Pro	Arg	Pro	Pro	Ser	Phe	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Ala	Met		
			340					345						350			
Val	Ser	Val	Gly	Gly	Ala	Thr	Phe	Met	Val	Gly	Asp	Ser	Gly	Tyr	Met		
		355					360					365					
Thr	Leu																
	370																

<210> 3  
 <211> 353  
 5 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> TRANSMEM  
 10 <222> (227)..(247)

ES 2 391 124 T3

<400> 3

Ala Ala Ala Ala Ala Val Thr Ser Arg Gly Asp Val Thr Val Val Cys  
 1 5 10 15  
 His Asp Leu Glu Thr Val Glu Val Thr Trp Gly Ser Gly Pro Asp His  
 20 25 30  
 His Ser Ala Asn Leu Ser Leu Glu Phe Arg Tyr Gly Thr Gly Ala Leu  
 35 40 45  
 Gln Pro Cys Pro Arg Tyr Phe Leu Ser Gly Ala Gly Val Thr Ser Gly  
 50 55 60  
 Cys Ile Leu Pro Ala Ala Arg Ala Gly Leu Leu Glu Leu Ala Leu Arg  
 65 70 75 80  
 Asp Gly Gly Gly Ala Met Val Phe Lys Ala Arg Gln Arg Ala Ser Ala  
 85 90 95  
 Trp Leu Lys Pro Arg Pro Pro Trp Asn Val Thr Leu Leu Trp Thr Pro  
 100 105 110  
 Asp Gly Asp Val Thr Val Ser Trp Pro Ala His Ser Tyr Leu Gly Leu  
 115 120 125  
 Asp Tyr Glu Val Gln His Arg Glu Ser Asn Asp Asp Glu Asp Ala Trp  
 130 135 140  
 Gln Thr Thr Ser Gly Pro Cys Cys Asp Leu Thr Val Gly Gly Leu Asp  
 145 150 155 160  
 Pro Ala Arg Cys Tyr Asp Phe Arg Val Arg Ala Ser Pro Arg Ala Ala  
 165 170 175  
 His Tyr Gly Leu Glu Ala Gln Pro Ser Glu Trp Thr Ala Val Thr Arg  
 180 185 190  
 Leu Ser Gly Ala Ala Ser Ala Gly Asp Pro Cys Ala Ala His Leu Pro  
 195 200 205  
 Pro Leu Ala Ser Cys Thr Ala Ser Pro Ala Pro Ser Pro Ala Leu Ala  
 210 215 220  
 Pro Pro Leu Leu Pro Leu Gly Cys Gly Leu Ala Ala Leu Leu Thr Leu  
 225 230 235 240  
 Ser Leu Leu Leu Ala Ala Leu Arg Leu Arg Arg Val Lys Asp Ala Leu  
 245 250 255  
 Leu Pro Cys Val Pro Asp Pro Ser Gly Ser Phe Pro Gly Leu Phe Glu  
 260 265 270

ES 2 391 124 T3

Lys His His Gly Asn Phe Gln Ala Trp Ile Ala Asp Ala Gln Ala Thr  
 275 280 285

Ala Pro Pro Ala Arg Thr Glu Glu Glu Asp Asp Leu Ile His Pro Lys  
 290 295 300

Ala Lys Arg Val Glu Pro Glu Asp Gly Thr Ser Leu Cys Thr Val Pro  
 305 310 315 320

Arg Pro Pro Ser Phe Glu Pro Arg Gly Pro Gly Gly Gly Ala Met Val  
 325 330 335

Ser Val Gly Gly Ala Thr Phe Met Val Gly Asp Ser Gly Tyr Met Thr  
 340 345 350

Leu

<210> 4  
 <211> 1116  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (1)..(1116)

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (1)..(66)

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (694)..(756)  
 <223> Secuencia codificante del dominio transmembrana predicho

20 <400> 4

atg ggg cgg ctg gtt ctg ctg tgg gga gct gcc gtc ttt ctg ctg gga 48  
 Met Gly Arg Leu Val Leu Leu Trp Gly Ala Ala Val Phe Leu Leu Gly  
 1 5 10 15

ggc tgg atg gct ttg ggg caa gga gga gca gca gaa gga gta cag att 96  
 Gly Trp Met Ala Leu Gly Gln Gly Gly Ala Ala Glu Gly Val Gln Ile  
 20 25 30

cag atc atc tac ttc aat tta gaa acc gtg cag gtg aca tgg aat gcc 144  
 Gln Ile Ile Tyr Phe Asn Leu Glu Thr Val Gln Val Thr Trp Asn Ala  
 35 40 45

agc aaa tac tcc agg acc aac ctg act ttc cac tac aga ttc aac ggt 192  
 Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Asn Leu Thr Phe His Tyr Arg Phe Asn Gly  
 50 55 60

gat gag gcc tat gac cag tgc acc aac tac ctt ctc cag gaa ggt cac 240  
 Asp Glu Ala Tyr Asp Gln Cys Thr Asn Tyr Leu Leu Gln Glu Gly His

ES 2 391 124 T3

65					70						75				80	
act	tca	ggg	tgc	ctc	cta	gac	gca	gag	cag	cga	gac	gac	att	ctc	tat	288
Thr	Ser	Gly	Cys	Leu	Leu	Asp	Ala	Glu	Gln	Arg	Asp	Asp	Ile	Leu	Tyr	
				85					90					95		
ttc	tcc	atc	agg	aat	ggg	acg	cac	ccc	gtt	ttc	acc	gca	agt	cgc	tgg	336
Phe	Ser	Ile	Arg	Asn	Gly	Thr	His	Pro	Val	Phe	Thr	Ala	Ser	Arg	Trp	
			100					105					110			
atg	gtt	tat	tac	ctg	aaa	ccc	agt	tcc	ccg	aag	cac	gtg	aga	ttt	tcg	384
Met	Val	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Pro	Ser	Ser	Pro	Lys	His	Val	Arg	Phe	Ser	
		115					120					125				
tgg	cat	cag	gat	gca	gtg	acg	gtg	acg	tgt	tct	gac	ctg	tcc	tac	ggg	432
Trp	His	Gln	Asp	Ala	Val	Thr	Val	Thr	Cys	Ser	Asp	Leu	Ser	Tyr	Gly	
	130					135					140					
gat	ctc	ctc	tat	gag	gtt	cag	tac	cgg	agc	ccc	ttc	gac	acc	gag	tgg	480
Asp	Leu	Leu	Tyr	Glu	Val	Gln	Tyr	Arg	Ser	Pro	Phe	Asp	Thr	Glu	Trp	
145				150						155				160		
cag	tcc	aaa	cag	gaa	aat	acc	tgc	aac	gtc	acc	ata	gaa	ggc	ttg	gat	528
Gln	Ser	Lys	Gln	Glu	Asn	Thr	Cys	Asn	Val	Thr	Ile	Glu	Gly	Leu	Asp	
				165					170					175		
gcc	gag	aag	tgt	tac	tct	ttc	tgg	gtc	agg	gtg	aag	gct	atg	gag	gat	576
Ala	Glu	Lys	Cys	Tyr	Ser	Phe	Trp	Val	Arg	Val	Lys	Ala	Met	Glu	Asp	
			180					185					190			
gta	tat	ggg	cca	gac	aca	tac	cca	agc	gac	tgg	tca	gag	gtg	aca	tgc	624
Val	Tyr	Gly	Pro	Asp	Thr	Tyr	Pro	Ser	Asp	Trp	Ser	Glu	Val	Thr	Cys	
		195					200					205				
tgg	cag	aga	ggc	gag	att	cgg	gat	gcc	tgt	gca	gag	aca	cca	acg	cct	672
Trp	Gln	Arg	Gly	Glu	Ile	Arg	Asp	Ala	Cys	Ala	Glu	Thr	Pro	Thr	Pro	
	210					215					220					
ccc	aaa	cca	aag	ctg	tcc	aaa	ttt	att	tta	att	tcc	agc	ctg	gcc	atc	720
Pro	Lys	Pro	Lys	Leu	Ser	Lys	Phe	Ile	Leu	Ile	Ser	Ser	Leu	Ala	Ile	
225				230					235					240		
ctt	ctg	atg	gtg	tct	ctc	ctc	ctt	ctg	tct	tta	tgg	aaa	tta	tgg	aga	768
Leu	Leu	Met	Val	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Trp	Lys	Leu	Trp	Arg	
				245					250					255		
gtg	aag	aag	ttt	ctc	att	ccc	agc	gtg	cca	gac	ccg	aaa	tcc	atc	ttc	816
Val	Lys	Lys	Phe	Leu	Ile	Pro	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Lys	Ser	Ile	Phe	
			260					265					270			
ccc	ggg	ctc	ttt	gag	ata	cac	caa	ggg	aac	ttc	cag	gag	tgg	atc	aca	864
Pro	Gly	Leu	Phe	Glu	Ile	His	Gln	Gly	Asn	Phe	Gln	Glu	Trp	Ile	Thr	
			275				280					285				
gac	acc	cag	aac	gtg	gcc	cac	ctc	cac	aag	atg	gca	ggt	gca	gag	caa	912
Asp	Thr	Gln	Asn	Val	Ala	His	Leu	His	Lys	Met	Ala	Gly	Ala	Glu	Gln	
	290					295					300					

ES 2 391 124 T3

```

gaa agt ggc ccc gag gag ccc ctg gta gtc cag ttg gcc aag act gaa 960
Glu Ser Gly Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Gln Leu Ala Lys Thr Glu
305 310 315 320

gcc gag tct ccc agg atg ctg gac cca cag acc gag gag aaa gag gcc 1008
Ala Glu Ser Pro Arg Met Leu Asp Pro Gln Thr Glu Glu Lys Glu Ala
325 330 335

tct ggg gga tcc ctc cag ctt ccc cac cag ccc ctc caa ggc ggt gat 1056
Ser Gly Gly Ser Leu Gln Leu Pro His Gln Pro Leu Gln Gly Gly Asp
340 345 350

gtg gtc aca atc ggg ggc ttc acc ttt gtg atg aat gac cgc tcc tac 1104
Val Val Thr Ile Gly Gly Phe Thr Phe Val Met Asn Asp Arg Ser Tyr
355 360 365

gtg gcg ttg tga 1116
Val Ala Leu
370

```

<210> 5  
 <211> 371  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 5

```

Met Gly Arg Leu Val Leu Leu Trp Gly Ala Ala Val Phe Leu Leu Gly
 1 5 10 15

Gly Trp Met Ala Leu Gly Gln Gly Gly Ala Ala Glu Gly Val Gln Ile
 20 25 30

Gln Ile Ile Tyr Phe Asn Leu Glu Thr Val Gln Val Thr Trp Asn Ala
 35 40 45

Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Asn Leu Thr Phe His Tyr Arg Phe Asn Gly
 50 55 60

Asp Glu Ala Tyr Asp Gln Cys Thr Asn Tyr Leu Leu Gln Glu Gly His
 65 70 75 80

Thr Ser Gly Cys Leu Leu Asp Ala Glu Gln Arg Asp Asp Ile Leu Tyr
 85 90 95

Phe Ser Ile Arg Asn Gly Thr His Pro Val Phe Thr Ala Ser Arg Trp
 100 105 110

Met Val Tyr Tyr Leu Lys Pro Ser Ser Pro Lys His Val Arg Phe Ser
 115 120 125

Trp His Gln Asp Ala Val Thr Val Thr Cys Ser Asp Leu Ser Tyr Gly
 130 135 140

Asp Leu Leu Tyr Glu Val Gln Tyr Arg Ser Pro Phe Asp Thr Glu Trp
 145 150 155 160

```

10

ES 2 391 124 T3

Gln Ser Lys Gln Glu Asn Thr Cys Asn Val Thr Ile Glu Gly Leu Asp  
 165 170 175

Ala Glu Lys Cys Tyr Ser Phe Trp Val Arg Val Lys Ala Met Glu Asp  
 180 185 190

Val Tyr Gly Pro Asp Thr Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Glu Val Thr Cys  
 195 200 205

Trp Gln Arg Gly Glu Ile Arg Asp Ala Cys Ala Glu Thr Pro Thr Pro  
 210 215 220

Pro Lys Pro Lys Leu Ser Lys Phe Ile Leu Ile Ser Ser Leu Ala Ile  
 225 230 235 240

Leu Leu Met Val Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Trp Lys Leu Trp Arg  
 245 250 255

Val Lys Lys Phe Leu Ile Pro Ser Val Pro Asp Pro Lys Ser Ile Phe  
 260 265 270

Pro Gly Leu Phe Glu Ile His Gln Gly Asn Phe Gln Glu Trp Ile Thr  
 275 280 285

Asp Thr Gln Asn Val Ala His Leu His Lys Met Ala Gly Ala Glu Gln  
 290 295 300

Glu Ser Gly Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Gln Leu Ala Lys Thr Glu  
 305 310 315 320

Ala Glu Ser Pro Arg Met Leu Asp Pro Gln Thr Glu Glu Lys Glu Ala  
 325 330 335

Ser Gly Gly Ser Leu Gln Leu Pro His Gln Pro Leu Gln Gly Gly Asp  
 340 345 350

Val Val Thr Ile Gly Gly Phe Thr Phe Val Met Asn Asp Arg Ser Tyr  
 355 360 365

Val Ala Leu  
 370

<210> 6  
 <211> 349  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> TRANSMEM  
 10 <222> (210)..(230)

<400> 6

Gln Gly Gly Ala Ala Glu Gly Val Gln Ile Gln Ile Ile Tyr Phe Asn  
 1 5 10 15

15

ES 2 391 124 T3

Leu Glu Thr Val Gln Val Thr Trp Asn Ala Ser Lys Tyr Ser Arg Thr  
 20 25 30  
 Asn Leu Thr Phe His Tyr Arg Phe Asn Gly Asp Glu Ala Tyr Asp Gln  
 35 40 45  
 Cys Thr Asn Tyr Leu Leu Gln Glu Gly His Thr Ser Gly Cys Leu Leu  
 50 55 60  
 Asp Ala Glu Gln Arg Asp Asp Ile Leu Tyr Phe Ser Ile Arg Asn Gly  
 65 70 75 80  
 Thr His Pro Val Phe Thr Ala Ser Arg Trp Met Val Tyr Tyr Leu Lys  
 85 90 95  
 Pro Ser Ser Pro Lys His Val Arg Phe Ser Trp His Gln Asp Ala Val  
 100 105 110  
 Thr Val Thr Cys Ser Asp Leu Ser Tyr Gly Asp Leu Leu Tyr Glu Val  
 115 120 125  
 Gln Tyr Arg Ser Pro Phe Asp Thr Glu Trp Gln Ser Lys Gln Glu Asn  
 130 135 140  
 Thr Cys Asn Val Thr Ile Glu Gly Leu Asp Ala Glu Lys Cys Tyr Ser  
 145 150 155 160  
 Phe Trp Val Arg Val Lys Ala Met Glu Asp Val Tyr Gly Pro Asp Thr  
 165 170 175  
 Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Glu Val Thr Cys Trp Gln Arg Gly Glu Ile  
 180 185 190  
 Arg Asp Ala Cys Ala Glu Thr Pro Thr Pro Pro Lys Pro Lys Leu Ser  
 195 200 205  
 Lys Phe Ile Leu Ile Ser Ser Leu Ala Ile Leu Leu Met Val Ser Leu  
 210 215 220  
 Leu Leu Leu Ser Leu Trp Lys Leu Trp Arg Val Lys Lys Phe Leu Ile  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Pro Asp Pro Lys Ser Ile Phe Pro Gly Leu Phe Glu Ile  
 245 250 255  
 His Gln Gly Asn Phe Gln Glu Trp Ile Thr Asp Thr Gln Asn Val Ala  
 260 265 270  
 His Leu His Lys Met Ala Gly Ala Glu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Glu  
 275 280 285  
 Pro Leu Val Val Gln Leu Ala Lys Thr Glu Ala Glu Ser Pro Arg Met  
 290 295 300  
 Leu Asp Pro Gln Thr Glu Glu Lys Glu Ala Ser Gly Gly Ser Leu Gln  
 305 310 315 320

ES 2 391 124 T3

Leu Pro His Gln Pro Leu Gln Gly Gly Asp Val Val Thr Ile Gly Gly  
 325 330 335  
 Phe Thr Phe Val Met Asn Asp Arg Ser Tyr Val Ala Leu  
 340 345

- <210> 7
- <211> 1140
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: TSLPR humano-FLAG
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1140)
- 15 <220>
- <221> sig\_peptide
- <222> (1)..(66)
- <220>
- 20 <221> misc\_feature
- <222> (694)..(756)
- <223> Secuencia codificante del dominio transmembrana predicho
- <220>
- 25 <221> misc\_feature
- <222> (1114)..(1140)
- <223> Secuencia codificante de FLAG

<400> 7  
 30 atg ggg cgg ctg gtt ctg ctg tgg gga gct gcc gtc ttt ctg ctg gga 48  
 Met Gly Arg Leu Val Leu Leu Trp Gly Ala Ala Val Phe Leu Leu Gly  
 1 5 10 15  
 ggc tgg atg gct ttg ggg caa gga gga gca gca gaa gga gta cag att 96  
 Gly Trp Met Ala Leu Gly Gln Gly Gly Ala Ala Glu Gly Val Gln Ile  
 20 25 30  
 cag atc atc tac ttc aat tta gaa acc gtg cag gtg aca tgg aat gcc 144  
 Gln Ile Ile Tyr Phe Asn Leu Glu Thr Val Gln Val Thr Trp Asn Ala  
 35 40 45  
 agc aaa tac tcc agg acc aac ctg act ttc cac tac aga ttc aac ggt 192  
 Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Asn Leu Thr Phe His Tyr Arg Phe Asn Gly  
 50 55 60  
 gat gag gcc tat gac cag tgc acc aac tac ctt ctc cag gaa ggt cac 240  
 Asp Glu Ala Tyr Asp Gln Cys Thr Asn Tyr Leu Leu Gln Glu Gly His  
 65 70 75 80  
 act tca ggg tgc ctc cta gac gca gag cag cga gac gac att ctc tat 288  
 Thr Ser Gly Cys Leu Leu Asp Ala Glu Gln Arg Asp Asp Ile Leu Tyr

ES 2 391 124 T3

					85						90						95	
ttc	tcc	atc	agg	aat	ggg	acg	cac	ccc	gtt	ttc	acc	gca	agt	cgc	tgg	336		
Phe	Ser	Ile	Arg	Asn	Gly	Thr	His	Pro	Val	Phe	Thr	Ala	Ser	Arg	Trp			
			100							105				110				
atg	gtt	tat	tac	ctg	aaa	ccc	agt	tcc	ccg	aag	cac	gtg	aga	ttt	tcg	384		
Met	Val	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Pro	Ser	Ser	Pro	Lys	His	Val	Arg	Phe	Ser			
			115							120				125				
tgg	cat	cag	gat	gca	gtg	acg	gtg	acg	tgt	tct	gac	ctg	tcc	tac	ggg	432		
Trp	His	Gln	Asp	Ala	Val	Thr	Val	Thr	Cys	Ser	Asp	Leu	Ser	Tyr	Gly			
			130							135				140				
gat	ctc	ctc	tat	gag	gtt	cag	tac	cgg	agc	ccc	ttc	gac	acc	gag	tgg	480		
Asp	Leu	Leu	Tyr	Glu	Val	Gln	Tyr	Arg	Ser	Pro	Phe	Asp	Thr	Glu	Trp			
145				150							155				160			
cag	tcc	aaa	cag	gaa	aat	acc	tgc	aac	gtc	acc	ata	gaa	ggc	ttg	gat	528		
Gln	Ser	Lys	Gln	Glu	Asn	Thr	Cys	Asn	Val	Thr	Ile	Glu	Gly	Leu	Asp			
			165							170				175				
gcc	gag	aag	tgt	tac	tct	ttc	tgg	gtc	agg	gtg	aag	gct	atg	gag	gat	576		
Ala	Glu	Lys	Cys	Tyr	Ser	Phe	Trp	Val	Arg	Val	Lys	Ala	Met	Glu	Asp			
			180							185				190				
gta	tat	ggg	cca	gac	aca	tac	cca	agc	gac	tgg	tca	gag	gtg	aca	tgc	624		
Val	Tyr	Gly	Pro	Asp	Thr	Tyr	Pro	Ser	Asp	Trp	Ser	Glu	Val	Thr	Cys			
			195							200				205				
tgg	cag	aga	ggc	gag	att	cgg	gat	gcc	tgt	gca	gag	aca	cca	acg	cct	672		
Trp	Gln	Arg	Gly	Glu	Ile	Arg	Asp	Ala	Cys	Ala	Glu	Thr	Pro	Thr	Pro			
			210							215				220				
ccc	aaa	cca	aag	ctg	tcc	aaa	ttt	att	tta	att	tcc	agc	ctg	gcc	atc	720		
Pro	Lys	Pro	Lys	Leu	Ser	Lys	Phe	Ile	Leu	Ile	Ser	Ser	Leu	Ala	Ile			
225				230							235				240			
ctt	ctg	atg	gtg	tct	ctc	ctc	ctt	ctg	tct	tta	tgg	aaa	tta	tgg	aga	768		
Leu	Leu	Met	Val	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Trp	Lys	Leu	Trp	Arg			
			245							250				255				
gtg	aag	aag	ttt	ctc	att	ccc	agc	gtg	cca	gac	ccg	aaa	tcc	atc	ttc	816		
Val	Lys	Lys	Phe	Leu	Ile	Pro	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Lys	Ser	Ile	Phe			
			260							265				270				
ccc	ggg	ctc	ttt	gag	ata	cac	caa	ggg	aac	ttc	cag	gag	tgg	atc	aca	864		
Pro	Gly	Leu	Phe	Glu	Ile	His	Gln	Gly	Asn	Phe	Gln	Glu	Trp	Ile	Thr			
			275							280				285				
gac	acc	cag	aac	gtg	gcc	cac	ctc	cac	aag	atg	gca	ggg	gca	gag	caa	912		
Asp	Thr	Gln	Asn	Val	Ala	His	Leu	His	Lys	Met	Ala	Gly	Ala	Glu	Gln			
			290							295				300				
gaa	agt	ggc	ccc	gag	gag	ccc	ctg	gta	gtc	cag	ttg	gcc	aag	act	gaa	960		
Glu	Ser	Gly	Pro	Glu	Glu	Pro	Leu	Val	Val	Gln	Leu	Ala	Lys	Thr	Glu			
305				310							315				320			

ES 2 391 124 T3

```

gcc gag tct ccc agg atg ctg gac cca cag acc gag gag aaa gag gcc 1008
Ala Glu Ser Pro Arg Met Leu Asp Pro Gln Thr Glu Glu Lys Glu Ala
                325                      330                      335

tct ggg gga tcc ctc cag ctt ccc cac cag ccc ctc caa ggc ggt gat 1056
Ser Gly Gly Ser Leu Gln Leu Pro His Gln Pro Leu Gln Gly Gly Asp
                340                      345                      350

gtg gtc aca atc ggg ggc ttc acc ttt gtg atg aat gac cgc tcc tac 1104
Val Val Thr Ile Gly Gly Phe Thr Phe Val Met Asn Asp Arg Ser Tyr
                355                      360                      365

gtg gcg ttg gac tac aag gac gac gat gac aag tag 1140
Val Ala Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
                370                      375

```

<210> 8

<211> 379

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: TSLPR humano-FLAG

<400> 8

```

Met Gly Arg Leu Val Leu Leu Trp Gly Ala Ala Val Phe Leu Leu Gly
 1          5          10          15

Gly Trp Met Ala Leu Gly Gln Gly Gly Ala Ala Glu Gly Val Gln Ile
          20          25          30

Gln Ile Ile Tyr Phe Asn Leu Glu Thr Val Gln Val Thr Trp Asn Ala
          35          40          45

Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Asn Leu Thr Phe His Tyr Arg Phe Asn Gly
          50          55          60

Asp Glu Ala Tyr Asp Gln Cys Thr Asn Tyr Leu Leu Gln Glu Gly His
          65          70          75          80

Thr Ser Gly Cys Leu Leu Asp Ala Glu Gln Arg Asp Asp Ile Leu Tyr
          85          90          95

Phe Ser Ile Arg Asn Gly Thr His Pro Val Phe Thr Ala Ser Arg Trp
          100          105          110

Met Val Tyr Tyr Leu Lys Pro Ser Ser Pro Lys His Val Arg Phe Ser
          115          120          125

Trp His Gln Asp Ala Val Thr Val Thr Cys Ser Asp Leu Ser Tyr Gly
          130          135          140

Asp Leu Leu Tyr Glu Val Gln Tyr Arg Ser Pro Phe Asp Thr Glu Trp
          145          150          155          160

```

ES 2 391 124 T3

Gln Ser Lys Gln Glu Asn Thr Cys Asn Val Thr Ile Glu Gly Leu Asp  
 165 170 175

Ala Glu Lys Cys Tyr Ser Phe Trp Val Arg Val Lys Ala Met Glu Asp  
 180 185 190

Val Tyr Gly Pro Asp Thr Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Glu Val Thr Cys  
 195 200 205

Trp Gln Arg Gly Glu Ile Arg Asp Ala Cys Ala Glu Thr Pro Thr Pro  
 210 215 220

Pro Lys Pro Lys Leu Ser Lys Phe Ile Leu Ile Ser Ser Leu Ala Ile  
 225 230 235 240

Leu Leu Met Val Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Trp Lys Leu Trp Arg  
 245 250 255

Val Lys Lys Phe Leu Ile Pro Ser Val Pro Asp Pro Lys Ser Ile Phe  
 260 265 270

Pro Gly Leu Phe Glu Ile His Gln Gly Asn Phe Gln Glu Trp Ile Thr  
 275 280 285

Asp Thr Gln Asn Val Ala His Leu His Lys Met Ala Gly Ala Glu Gln  
 290 295 300

Glu Ser Gly Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Gln Leu Ala Lys Thr Glu  
 305 310 315 320

Ala Glu Ser Pro Arg Met Leu Asp Pro Gln Thr Glu Glu Lys Glu Ala  
 325 330 335

Ser Gly Gly Ser Leu Gln Leu Pro His Gln Pro Leu Gln Gly Gly Asp  
 340 345 350

Val Val Thr Ile Gly Gly Phe Thr Phe Val Met Asn Asp Arg Ser Tyr  
 355 360 365

Val Ala Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 370 375

- <210> 9
- <211> 357
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: TSLPR humano-FLAG
- <220>
- <221> TRANSMEM
- <222> (210)..(230)
- 15 <220>
- <221> DOMINIO
- <222> (350)..(357)
- <223> Secuencia de FLAG
- 20 <400> 9

ES 2 391 124 T3

Gln Gly Gly Ala Ala Glu Gly Val Gln Ile Gln Ile Ile Tyr Phe Asn  
 1 5 10 15  
 Leu Glu Thr Val Gln Val Thr Trp Asn Ala Ser Lys Tyr Ser Arg Thr  
 20 25 30  
 Asn Leu Thr Phe His Tyr Arg Phe Asn Gly Asp Glu Ala Tyr Asp Gln  
 35 40 45  
 Cys Thr Asn Tyr Leu Leu Gln Glu Gly His Thr Ser Gly Cys Leu Leu  
 50 55 60  
 Asp Ala Glu Gln Arg Asp Asp Ile Leu Tyr Phe Ser Ile Arg Asn Gly  
 65 70 75 80  
 Thr His Pro Val Phe Thr Ala Ser Arg Trp Met Val Tyr Tyr Leu Lys  
 85 90 95  
 Pro Ser Ser Pro Lys His Val Arg Phe Ser Trp His Gln Asp Ala Val  
 100 105 110  
 Thr Val Thr Cys Ser Asp Leu Ser Tyr Gly Asp Leu Leu Tyr Glu Val  
 115 120 125  
 Gln Tyr Arg Ser Pro Phe Asp Thr Glu Trp Gln Ser Lys Gln Glu Asn  
 130 135 140  
 Thr Cys Asn Val Thr Ile Glu Gly Leu Asp Ala Glu Lys Cys Tyr Ser  
 145 150 155 160  
 Phe Trp Val Arg Val Lys Ala Met Glu Asp Val Tyr Gly Pro Asp Thr  
 165 170 175  
 Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Glu Val Thr Cys Trp Gln Arg Gly Glu Ile  
 180 185 190  
 Arg Asp Ala Cys Ala Glu Thr Pro Thr Pro Pro Lys Pro Lys Leu Ser  
 195 200 205  
 Lys Phe Ile Leu Ile Ser Ser Leu Ala Ile Leu Leu Met Val Ser Leu  
 210 215 220  
 Leu Leu Leu Ser Leu Trp Lys Leu Trp Arg Val Lys Lys Phe Leu Ile  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Pro Asp Pro Lys Ser Ile Phe Pro Gly Leu Phe Glu Ile  
 245 250 255  
 His Gln Gly Asn Phe Gln Glu Trp Ile Thr Asp Thr Gln Asn Val Ala  
 260 265 270

ES 2 391 124 T3

His Leu His Lys Met Ala Gly Ala Glu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Glu  
 275 280 285

Pro Leu Val Val Gln Leu Ala Lys Thr Glu Ala Glu Ser Pro Arg Met  
 290 295 300

Leu Asp Pro Gln Thr Glu Glu Lys Glu Ala Ser Gly Gly Ser Leu Gln  
 305 310 315 320

Leu Pro His Gln Pro Leu Gln Gly Gly Asp Val Val Thr Ile Gly Gly  
 325 330 335

Phe Thr Phe Val Met Asn Asp Arg Ser Tyr Val Ala Leu Asp Tyr Lys  
 340 345 350

Asp Asp Asp Asp Lys  
 355

<210> 10  
 <211> 1379  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Clon 9604927 que contiene la secuencia de TSLPR humano  
 10

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(68)  
 <223> Secuencia de vector  
 15

<220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (70)..(135)

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (763)..(825)  
 <223> Secuencia codificante del dominio transmembrana predicho

25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1186)..(1379)  
 <223> Secuencia de vector

30 <400> 10

ggatccacta gtaacggccg ccagtgtgct ggaattctgc agatatccat cacactggcg 60  
 gccgccacca tggggcggct ggttctgctg tggggagctg ccgtctttct gctgggagge 120  
 tggatggctt tggggcaagg aggagcagca gaaggagtac agattcagat catctacttc 180  
 aatttagaaa ccgtgcaggt gacatggaat gccagcaaat actccaggac caacctgact 240  
 ttccactaca gattcaacgg tgatgaggcc tatgaccagt gcaccaacta ccttctccag 300

ES 2 391 124 T3

gaaggtcaca cttcaggggtg cctcctagac gcagagcagc gagacgacat tctctatttc 360  
 tccatcagga atgggacgca ccccgttttc acogcaagtc gctggatggt ttattacctg 420  
 aaaccagtt cccogaagca cgtgagatth tcgtggcacc aggatgcagt gacggtgacg 480  
 tgttctgacc tgtcctacgg ggatctctc tatgaggttc agtaccggag ccccttcgac 540  
 accgagtggc agtccaaaca ggaaaatacc tgcaacgtca ccatagaagg cttggatgcc 600  
 gagaagtgtt actctttctg ggtcaggggtg aaggctatgg aggatgtata tgggccagac 660  
 acatacccaa gcgactggtc agaggtgaca tgcctggcaga gaggcgagat tcgggatgcc 720  
 tgtgcagaga caccaacgcc tcccaaacca aagctgtcca aatttatttt aatttccagc 780  
 ctggccatcc ttctgatggt gtctctctc cttctgtctt tatggaaatt atggagagtg 840  
 aagaagtttc tcattcccag cgtgccagac ccgaaatcca tcttcccgg gctctttgag 900  
 atacaccaag ggaacttcca ggagtggatc acagacaccc agaacgtggc ccacctccac 960  
 aagatggcag gtgcagagca agaaagtggc cccgaggagc ccctggtagt ccagttggcc 1020  
 aagactgaag ccgagtctcc caggatgctg gaccacaga ccgaggagaa agaggcctct 1080  
 gggggatccc tccagcttcc ccaccagccc ctccaaggcg gtgatgtggt cacaatcggg 1140  
 ggcttcacct ttgtgatgaa tgaccgctcc tacgtggcgt tgtgatctaa agggccctat 1200  
 tctatactgt cacctaaatg ctagagctcg ctgatcagcc togactgtgc cttctagttg 1260  
 ccagccatct gttgtttgcc cctccccgt gccttccttg accctggaat gtgccactcc 1320  
 cactgtcctt tcctaataaa atgaagaaat tgcacocgca ttgtctgagt aggtgtcta 1379

- <210> 11
- <211> 1415
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
  
- <220>
- 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Clon 9508990 que contiene la secuencia de TSLPR humano-FLAG
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1)..(60)
- <223> Secuencia de vector
- 15 <220>
- <221> sig\_peptide
- <222> (62)..(127)
- 20 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (755)..(817)
- <223> Secuencia codificante del dominio transmembrana predicho
- 25 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1175)..(1201)
- <223> Secuencia codificante de FLAG

ES 2 391 124 T3

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1202)..(1415)  
 <223> Secuencia de vector

5 <400> 11

```

ggatccacta gtaacggccg ccagtggtgct ggaattctgc agatatccat cacactggcc 60
catggggcgg ctggttctgc tgtgggggagc tgccgtcttt ctgctgggag gctggatggc 120
tttggggcaa ggaggagcag cagaaggagt acagattcag atcatctact tcaatttaga 180
aaccgtgcag gtgacatgga atgccagcaa atactccagg accaacctga ctttccacta 240
cagattcaac ggtgatgagg cctatgacca gtgcaccaac taccttctcc aggaaggcca 300
cacttcaggg tgccctctag acgcagagca gcgagacgac attctctatt tctccatcag 360
gaatgggacg caccctggtt tcaccgcaag tcgctggatg gtttattacc tgaaacccag 420
ttccccgaag cacgtgagat tttcgtggca tcaggatgca gtgacgggta cgtgttctga 480
cctgtcctac ggggatctcc tctatgaggt tcagtaccgg agccccttcg acaccgagtg 540
gcagtcctaaa caggaaaata cctgcaacgt caccatagaa ggcttggatg ccgagaagtg 600
ttactctttc tgggtcaggg tgaaggctat ggaggatgta tatggggcag acacataccc 660
aagcgactgg tcagaggtga catgctggca gagaggcgag attcgggatg cctgtgcaga 720
gacaccaacg cctcccaaac caaagctgtc caaatttatt ttaatttcca gcctggccat 780
ccttctgatg gtgtctctcc tccttctgtc tttatggaaa ttatggagag tgaagaagtt 840
tctcattccc agcgtgccag acccgaaatc catcttcccc gggctctttg agatacacca 900
agggaaactc caggagtgga tcacagacac ccagaacgtg gcccacctcc acaagatggc 960
aggtgcagag caagaaaagtg gccccgagga gccctggta gtccagttgg ccaagactga 1020
agccgagtct cccaggatgc tggaccaca gaccgaggag aaagaggcct ctgggggatc 1080
cctccagctt ccccaccagc ccctccaagg cggatgatgtg gtcacaatcg ggggcttcac 1140
ctttgtgatg aatgaccgct cctacgtggc gttggactac aaggacgacg atgacaagta 1200
gtctagaggg ccctattcta tagtgtcacc taaatgctag agctcgtctga tcagactcga 1260
ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgcccctc ccccgtgcct tccttgacce 1320
tggaaggtgc cactcccact gtcccttctt aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 1380
tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg gcgctt 1415
  
```

10

<210> 12  
 <211> 369  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

15

<400> 12

ES 2 391 124 T3

Met Leu Lys Leu Leu Leu Ser Pro Arg Ser Phe Leu Val Leu Gln Leu  
1 5 10 15

Leu Leu Leu Arg Ala Gly Trp Ser Ser Lys Val Leu Met Ser Ser Ala  
20 25 30

Asn Glu Asp Ile Lys Ala Asp Leu Ile Leu Thr Ser Thr Ala Pro Glu  
35 40 45

His Leu Ser Ala Pro Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val  
50 55 60

Phe Asn Ile Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro  
65 70 75 80

Gln Ala Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Arg Tyr Lys Val Ser Asp Asn  
85 90 95

Asn Thr Phe Gln Glu Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Lys Glu Ile Thr  
100 105 110

Ser Gly Cys Gln Ile Gln Lys Glu Asp Ile Gln Leu Tyr Gln Thr Phe  
115 120 125

Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Gln Lys Pro Gln Arg Arg Ala Val Gln  
130 135 140

Lys Leu Asn Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Arg Ala Pro Glu Asn Leu  
145 150 155 160

Thr Leu Ser Asn Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Arg Trp Lys Ser  
165 170 175

Arg His Ile Lys Glu Arg Cys Leu Gln Tyr Leu Val Gln Tyr Arg Ser  
180 185 190

Asn Arg Asp Arg Ser Trp Thr Glu Leu Ile Val Asn His Glu Pro Arg  
195 200 205

Phe Ser Leu Pro Ser Val Asp Glu Leu Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val  
210 215 220

Arg Ser Arg Tyr Asn Pro Ile Cys Gly Ser Ser Gln Gln Trp Ser Lys  
225 230 235 240

ES 2 391 124 T3

Trp Ser Gln Pro Val His Trp Gly Ser His Thr Val Glu Glu Asn Pro  
 245 250 255

Ser Leu Phe Ala Leu Glu Ala Val Leu Ile Pro Val Gly Thr Met Gly  
 260 265 270

Leu Ile Ile Thr Leu Ile Phe Val Tyr Cys Trp Leu Glu Arg Met Pro  
 275 280 285

Pro Ile Pro Pro Ile Lys Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr Gln  
 290 295 300

Gly Asn Phe Ser Ala Trp Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Thr Glu Ser  
 305 310 315 320

Leu Gln Pro Asp Tyr Ser Glu Arg Phe Cys His Val Ser Glu Ile Pro  
 325 330 335

Pro Lys Gly Gly Ala Leu Gly Glu Gly Pro Gly Gly Ser Pro Cys Ser  
 340 345 350

Leu His Ser Pro Tyr Trp Pro Pro Pro Cys Tyr Ser Leu Lys Pro Glu  
 355 360 365

Ala

- <210> 13
- <211> 11
- 5 <212> PRT
- <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
- <400> 13
  
- Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
- 1 5 10
- 10
- <210> 14
- <211> 15
- <212> PRT
- 15 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Dominio de internalización derivado de la proteína tat del VIH
- 20 <400> 14
  
- Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
- 1 5 10 15
- 25
- <210> 15
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 30 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Motivo conservado del receptor de citocinas de tipo I
- <220>
- <221> NO SEGURO
- <222> (3)
- 35 <223> "Xaa" puede ser cualquier aminoácido de origen natural

# ES 2 391 124 T3

<400> 15

Trp Ser Xaa Trp Ser  
1 5

5 <210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Motivo que reemplaza el motivo conservado del receptor de citocinas de tipo I en el polipéptido TSLPR murino

<400> 16

15

Trp Thr Ala Val Thr  
1 5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une específicamente al polipéptido de la SEC ID N°: 6 para inhibir la unión de la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) al receptor de linfopoyetina estromal tímica (TSLPR) *in vitro*.
- 10 2. Uso de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une específicamente al polipéptido de la SEC ID N°: 6 y que es capaz de inhibir la unión de la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) al receptor de linfopoyetina estromal tímica (TSLPR) en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad, trastorno o afección relacionada con la TSLP.
- 15 3. Un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo que se une específicamente al polipéptido de la SEC ID N°: 6 y que es capaz de inhibir la unión de la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) al receptor de linfopoyetina estromal tímica (TSLPR), para el uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección relacionada con la TSLP.
- 20 4. El uso de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo de las reivindicaciones 1 ó 2, o un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo de la reivindicación 3, para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con la TSLP, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- 25 5. El uso de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo de las reivindicaciones 1 ó 2, o un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo de la reivindicación 3, para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con la TSLP, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.
- 30 6. El uso de un anticuerpo antagonista de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 5, o un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo de las reivindicaciones 3-5, para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con la TSLP, en el que el fragmento de anticuerpo comprende una o más regiones variables de dicho anticuerpo.
7. Uso de un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o un anticuerpo antagonista o fragmento del mismo de la reivindicación 3, para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con la TSLP, para inhibir la activación del factor de transcripción Stat5.

FIG. 1A

```

ccccctctc gccgaccct gaccccgccc cgccccgccc acccaggggc ccagacctga 60
gcggcgggcca ggtcgcgggt gacgtcacag ggccggtgcc ccatccgtcc cgtggcctgg 120
acggacagag ctgaggcagg ggaataaccg cgagtgctga g atg gca tgg gca ctc 176
                                     Met Ala Trp Ala Leu
                                     1                               5

gcg gtc atc ctc ctg cct cgg ctc ctt gcg gcg gca gcg gcg gcg gcg 224
Ala Val Ile Leu Leu Pro Arg Leu Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
                                     10                               15                               20

gcg gtg acg tca cgg ggt gat gtc aca gtc gtc tgc cat gac ctg gag 272
Ala Val Thr Ser Arg Gly Asp Val Thr Val Val Cys His Asp Leu Glu
                                     25                               30                               35

acg gtg gag gtc acg tgg ggc tgc ggc ccc gac cac cac agc gcc aac 320
Thr Val Glu Val Thr Trp Gly Ser Gly Pro Asp His His Ser Ala Asn
                                     40                               45                               50

ttg agc ctg gag ttc cgt tat ggt act ggc gcc ctg caa ccc tgc ccg 368
Leu Ser Leu Glu Phe Arg Tyr Gly Thr Gly Ala Leu Gln Pro Cys Pro
                                     55                               60                               65

cga tat ttc ctg tcc ggc gct ggt gtc act tcc ggg tgc atc ctc ccc 416
Arg Tyr Phe Leu Ser Gly Ala Gly Val Thr Ser Gly Cys Ile Leu Pro
                                     70                               75                               80                               85

gcg gcg agg gcg ggg ctg ctg gag ctg gca ctg cgc gac gga ggc ggg 464
Ala Ala Arg Ala Gly Leu Leu Glu Leu Ala Leu Arg Asp Gly Gly Gly
                                     90                               95                               100

gcc atg gtg ttt aag gct agg cag cgc gcg tcc gcc tgg ctg aag ccc 512
Ala Met Val Phe Lys Ala Arg Gln Arg Ala Ser Ala Trp Leu Lys Pro
                                     105                               110                               115

cgc cca cct tgg aat gtg acg ctg ctc tgg aca cca gac ggg gac gtg 560
Arg Pro Pro Trp Asn Val Thr Leu Leu Trp Thr Pro Asp Gly Asp Val
                                     120                               125                               130

act gtc tcc tgg cct gcc cac tcc tac ctg ggc ctg gac tac gag gtg 608
Thr Val Ser Trp Pro Ala His Ser Tyr Leu Gly Leu Asp Tyr Glu Val
                                     135                               140                               145

cag cac cgg gag agc aat gac gat gag gac gcc tgg cag acg acc tca 656
Gln His Arg Glu Ser Asn Asp Asp Glu Asp Ala Trp Gln Thr Thr Ser
                                     150                               155                               160                               165

ggg ccc tgc tgt gac ttg aca gtg ggc ggg ctc gac ccc gcg cgc tgc 704
Gly Pro Cys Cys Asp Leu Thr Val Gly Gly Leu Asp Pro Ala Arg Cys
                                     170                               175                               180

```

FIG. 1B

tat gac ttc cgg gtt cgg gcg tcg ccc cgg gcc gcg cac tat ggc ctg	752
Tyr Asp Phe Arg Val Arg Ala Ser Pro Arg Ala Ala His Tyr Gly Leu	
185 190 195	
gag gcg cag cct agc gag tgg aca gcg gtg aca agg ctt tcc ggg gca	800
Glu Ala Gln Pro Ser Glu Trp Thr Ala Val Thr Arg Leu Ser Gly Ala	
200 205 210	
gca tcc gcg ggt gac ccc tgc gcc gcc cac ctt ccc ccc cta gcc tcc	848
Ala Ser Ala Gly Asp Pro Cys Ala Ala His Leu Pro Pro Leu Ala Ser	
215 220 225	
tgt acc gca agc ccc gcc cca tcc ccg gcc ctg gcc ccg ccc ctc ctg	896
Cys Thr Ala Ser Pro Ala Pro Ser Pro Ala Leu Ala Pro Pro <u>Leu Leu</u>	
230 235 240 245	
ccc ctg ggc tgc ggc cta gca gcg ctg ctg aca ctg tcc ctg ctc ctg	944
<u>Pro Leu Gly Cys Gly Leu Ala Ala Leu Leu Thr Leu Ser Leu Leu Leu</u>	
250 255 260	
gcc gcc ctg agg ctt cgc agg gtg aaa gat gcg ctg ctg ccc tgc gtc	992
<u>Ala Ala Leu</u> Arg Leu Arg Arg Val Lys Asp Ala Leu Leu Pro Cys Val	
265 270 275	
cct gac ccc agc ggc tcc ttc cct gga ctc ttt gag aag cat cac ggg	1040
Pro Asp Pro Ser Gly Ser Phe Pro Gly Leu Phe Glu Lys His His Gly	
280 285 290	
aac ttc cag gcc tgg att gcg gac gcc cag gcc aca gcc ccg cca gcc	1088
Asn Phe Gln Ala Trp Ile Ala Asp Ala Gln Ala Thr Ala Pro Pro Ala	
295 300 305	
agg acc gag gag gaa gat gac ctc atc cac ccc aag gct aag agg gtg	1136
Arg Thr Glu Glu Glu Asp Asp Leu Ile His Pro Lys Ala Lys Arg Val	
310 315 320 325	
gag ccc gag gat ggc acc tcc ctc tgc acc gtg cca agg cca ccc agc	1184
Glu Pro Glu Asp Gly Thr Ser Leu Cys Thr Val Pro Arg Pro Pro Ser	
330 335 340	
ttc gag cca agg ggg ccg gga ggc ggg gcc atg gtg tca gtg ggc ggg	1232
Phe Glu Pro Arg Gly Pro Gly Gly Gly Ala Met Val Ser Val Gly Gly	
345 350 355	
gcc acg ttc atg gtg ggc gac agc ggc tac atg acc ctg tga	1274
Ala Thr Phe Met Val Gly Asp Ser Gly Tyr Met Thr Leu	
360 365 370	
ccttgaagtc actgccagtc tatacttcag gctgaggcca cttcctgtct ttaaataatt	1334
caaactcaca aatcctgtgc ctgtctgtat gcaaatgtgg tcacgaatat tcaaataaaa	1394
tgcaaatgct atgct	1409

FIG. 2

MAWLA VILLPRLCAAAAANA-----R-----VTSRG TSLPR  
 MLKLLSPRSFLVQLLLLRRA-GWSBKVLMSSANEDIKADLLITSTAPEHLSAPTLPFP  $\gamma$ c

DVTVVCHDLEITVEVTVWSSGPDHHSANLSLEFRY--G-TGALQPCPNVFLSAGAVTSGCILL  
 EVQCFVFNIEYMNCTWNSSEPEQATNLTLEHYRYKVSNDNNTFOCSHYLFS-KEITSGCQI

PAARAGLE-LALR-DGGGAMVFKARCRASAW-LK-PRPPWNVTLNTPDGDVTVSWPA-  
 QKEDIQLYQTFVVQLQDPQRPFAVQKLNQNLQNLVI PRAPENLTL SNLSESOLELRWKS R

H-SYLGDIYEQHRESNDDAM-QTSGCCDLTVGGLDPARCYDFVRASPPRAHY-GL  
 HIKERCILQYLQNR-SNRDR-SWTELVNHEPRFSLPSVDELKRYVFRVR-S-RYNPICGS

EAQPSWLA VTRLSGAASAGDPCAHL PPLASCFASAPSPALAFALAPHLPLGC-GLAALITL  
 SQQ---MSKWSQFVHW-----GSHVVEENPS--L-FALAEAVLLIPEVGMGLLI--TL

SLLLAALRLRIRVKDALLPCVDPDFSGSFP-GLFEKHGNFQAWLADAQATAPPARTEEDDLIHTKAKRVE  
 IFVYCNL---ERM-----P---PIPPKLNLELLVTEYQGNFSAWSGVSKGL-----TESLQ

HEDGTSICIVRPPPFEPFRGCGGAMVSV-GGATFVNGDSGYMTL  
 PDYSERFCHVEI PPK-----GGALGEGFGGSPCSLH-SPYWP PPCYSLKPEA

FIG. 3A

atg ggg cgg ctg gtt ctg ctg tgg gga gct gcc gtc ttt ctg ctg gga	48
Met Gly Arg Leu Val Leu Leu Trp Gly Ala Ala Val Phe Leu Leu Gly	
1 5 10 15	
ggc tgg atg gct ttg ggg caa gga gga gca gca gaa gga gta cag att	96
Gly Trp Met Ala Leu Gly Gln Gly Gly Ala Ala Glu Gly Val Gln Ile	
20 25 30	
cag atc atc tac ttc aat tta gaa acc gtg cag gtg aca tgg aat gcc	144
Gln Ile Ile Tyr Phe Asn Leu Glu Thr Val Gln Val Thr Trp Asn Ala	
35 40 45	
agc aaa tac tcc agg acc aac ctg act ttc cac tac aga ttc aac ggt	192
Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Asn Leu Thr Phe His Tyr Arg Phe Asn Gly	
50 55 60	
gat gag gcc tat gac cag tgc acc aac tac ctt ctc cag gaa ggt cac	240
Asp Glu Ala Tyr Asp Gln Cys Thr Asn Tyr Leu Leu Gln Glu Gly His	
65 70 75 80	
act tca ggg tgc ctc cta gac gca gag cag cga gac gac att ctc tat	288
Thr Ser Gly Cys Leu Leu Asp Ala Glu Gln Arg Asp Asp Ile Leu Tyr	
85 90 95	
ttc tcc atc agg aat ggg acg cac ccc gtt ttc acc gca agt cgc tgg	336
Phe Ser Ile Arg Asn Gly Thr His Pro Val Phe Thr Ala Ser Arg Trp	
100 105 110	
atg gtt tat tac ctg aaa ccc agt tcc ccg aag cac gtg aga ttt tcg	384
Met Val Tyr Tyr Leu Lys Pro Ser Ser Pro Lys His Val Arg Phe Ser	
115 120 125	
tgg cat cag gat gca gtg acg gtg acg tgt tct gac ctg tcc tac ggg	432
Trp His Gln Asp Ala Val Thr Val Thr Cys Ser Asp Leu Ser Tyr Gly	
130 135 140	
gat ctc ctc tat gag gtt cag tac cgg agc ccc ttc gac acc gag tgg	480
Asp Leu Leu Tyr Glu Val Gln Tyr Arg Ser Pro Phe Asp Thr Glu Trp	
145 150 155 160	
cag tcc aaa cag gaa aat acc tgc aac gtc acc ata gaa ggc ttg gat	528
Gln Ser Lys Gln Glu Asn Thr Cys Asn Val Thr Ile Glu Gly Leu Asp	
165 170 175	
gcc gag aag tgt tac tct ttc tgg gtc agg gtg aag gct atg gag gat	576
Ala Glu Lys Cys Tyr Ser Phe Trp Val Arg Val Lys Ala Met Glu Asp	
180 185 190	
gta tat ggg cca gac aca tac cca agc gac tgg tca gag gtg aca tgc	624
Val Tyr Gly Pro Asp Thr Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Glu Val Thr Cys	
195 200 205	

FIG. 3B

tg	g	c	a	g	a	g	a	g	a	t	c	g	g	a	t	g	c	a	g	a	c	a	c	a	c	a	c	g	c	t		672	
Trp	Gln	Arg	Gly	Glu	Ile	Arg	Asp	Ala	Cys	Ala	Glu	Thr	Pro	Thr	Pro																		
	210						215				220																						
ccc	aaa	cca	aag	ctg	tcc	aaa	ttt	att	tta	att	tcc	agc	ctg	gcc	atc																	720	
Pro	Lys	Pro	Lys	Leu	Ser	Lys	<u>Phe</u>	<u>Ile</u>	<u>Leu</u>	<u>Ile</u>	<u>Ser</u>	<u>Ser</u>	<u>Leu</u>	<u>Ala</u>	<u>Ile</u>																		
	225				230						235				240																		
ctt	ctg	atg	gtg	tct	ctc	ctc	ctt	ctg	tct	tta	tgg	aaa	tta	tgg	aga																	768	
<u>Leu</u>	<u>Leu</u>	<u>Met</u>	<u>Val</u>	<u>Ser</u>	<u>Leu</u>	<u>Leu</u>	<u>Leu</u>	<u>Leu</u>	<u>Ser</u>	<u>Leu</u>	<u>Trp</u>	Lys	Leu	Trp	Arg																		
				245					250						255																		
gtg	aag	aag	ttt	ctc	att	ccc	agc	gtg	cca	gac	ccg	aaa	tcc	atc	ttc																	816	
Val	Lys	Lys	Phe	Leu	Ile	Pro	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Lys	Ser	Ile	Phe																		
			260					265					270																				
ccc	ggg	ctc	ttt	gag	ata	cac	caa	ggg	aac	ttc	cag	gag	tgg	atc	aca																	864	
Pro	Gly	Leu	Phe	Glu	Ile	His	Gln	Gly	Asn	Phe	Gln	Glu	Trp	Ile	Thr																		
		275					280					285																					
gac	acc	cag	aac	gtg	gcc	cac	ctc	cac	aag	atg	gca	ggt	gca	gag	caa																	912	
Asp	Thr	Gln	Asn	Val	Ala	His	Leu	His	Lys	Met	Ala	Gly	Ala	Glu	Gln																		
	290					295					300																						
gaa	agt	ggc	ccc	gag	gag	ccc	ctg	gta	gtc	cag	ttg	gcc	aag	act	gaa																	960	
Glu	Ser	Gly	Pro	Glu	Glu	Pro	Leu	Val	Val	Gln	Leu	Ala	Lys	Thr	Glu																		
	305				310					315				320																			
gcc	gag	tct	ccc	agg	atg	ctg	gac	cca	cag	acc	gag	gag	aaa	gag	gcc																	1008	
Ala	Glu	Ser	Pro	Arg	Met	Leu	Asp	Pro	Gln	Thr	Glu	Glu	Lys	Glu	Ala																		
				325					330					335																			
tct	ggg	gga	tcc	ctc	cag	ctt	ccc	cac	cag	ccc	ctc	caa	ggc	ggt	gat																	1056	
Ser	Gly	Gly	Ser	Leu	Gln	Leu	Pro	His	Gln	Pro	Leu	Gln	Gly	Gly	Asp																		
			340					345					350																				
gtg	gtc	aca	atc	ggg	ggc	ttc	acc	ttt	gtg	atg	aat	gac	cgc	tcc	tac																	1104	
Val	Val	Thr	Ile	Gly	Gly	Phe	Thr	Phe	Val	Met	Asn	Asp	Arg	Ser	Tyr																		
		355					360					365																					
gtg	gcg	ttg	tga																													1116	
Val	Ala	Leu																															
	370																																

## FIG. 4A

atg ggg cgg ctg gtt ctg ctg tgg gga gct gcc gtc ttt ctg ctg gga	48
Met Gly Arg Leu Val Leu Leu Trp Gly Ala Ala Val Phe Leu Leu Gly	
1 5 10 15	
ggc tgg atg gct ttg ggg caa gga gga gca gca gaa gga gta cag att	96
Gly Trp Met Ala Leu Gly Gln Gly Gly Ala Ala Glu Gly Val Gln Ile	
20 25 30	
cag atc atc tac ttc aat tta gaa acc gtg cag gtg aca tgg aat gcc	144
Gln Ile Ile Tyr Phe Asn Leu Glu Thr Val Gln Val Thr Trp Asn Ala	
35 40 45	
agc aaa tac tcc agg acc aac ctg act ttc cac tac aga ttc aac ggt	192
Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Asn Leu Thr Phe His Tyr Arg Phe Asn Gly	
50 55 60	
gat gag gcc tat gac cag tgc acc aac tac ctt ctc cag gaa ggt cac	240
Asp Glu Ala Tyr Asp Gln Cys Thr Asn Tyr Leu Leu Gln Glu Gly His	
65 70 75 80	
act tca ggg tgc ctc cta gac gca gag cag cga gac gac att ctc tat	288
Thr Ser Gly Cys Leu Leu Asp Ala Glu Gln Arg Asp Asp Ile Leu Tyr	
85 90 95	
ttc tcc atc agg aat ggg acg cac ccc gtt ttc acc gca agt cgc tgg	336
Phe Ser Ile Arg Asn Gly Thr His Pro Val Phe Thr Ala Ser Arg Trp	
100 105 110	
atg gtt tat tac ctg aaa ccc agt tcc ccg aag cac gtg aga ttt tcg	384
Met Val Tyr Tyr Leu Lys Pro Ser Ser Pro Lys His Val Arg Phe Ser	
115 120 125	
tgg cat cag gat gca gtg acg gtg acg tgt tct gac ctg tcc tac ggg	432
Trp His Gln Asp Ala Val Thr Val Thr Cys Ser Asp Leu Ser Tyr Gly	
130 135 140	
gat ctc ctc tat gag gtt cag tac cgg agc ccc ttc gac acc gag tgg	480
Asp Leu Leu Tyr Glu Val Gln Tyr Arg Ser Pro Phe Asp Thr Glu Trp	
145 150 155 160	
cag tcc aaa cag gaa aat acc tgc aac gtc acc ata gaa ggc ttg gat	528
Gln Ser Lys Gln Glu Asn Thr Cys Asn Val Thr Ile Glu Gly Leu Asp	
165 170 175	
gcc gag aag tgt tac tct ttc tgg gtc agg gtg aag gct atg gag gat	576
Ala Glu Lys Cys Tyr Ser Phe Trp Val Arg Val Lys Ala Met Glu Asp	
180 185 190	
gta tat ggg cca gac aca tac cca agc gac tgg tca gag gtg aca tgc	624
Val Tyr Gly Pro Asp Thr Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Glu Val Thr Cys	
195 200 205	

FIG. 4B

tgg cag aga ggc gag att cgg gat gcc tgt gca gag aca cca acg cct	672
Trp Gln Arg Gly Glu Ile Arg Asp Ala Cys Ala Glu Thr Pro Thr Pro	
210 215 220	
ccc aaa cca aag ctg tcc aaa ttt att tta att tcc agc ctg gcc atc	720
Pro Lys Pro Lys Leu Ser Lys <u>Phe Ile Leu Ile Ser Ser Leu Ala Ile</u>	
225 230 235 240	
ctt ctg atg gtg tct ctc ctc ctt ctg tct tta tgg aaa tta tgg aga	768
<u>Leu Leu Met Val Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Trp</u> Lys Leu Trp Arg	
245 250 255	
gtg aag aag ttt ctc att ccc agc gtg cca gac ccg aaa tcc atc ttc	816
Val Lys Lys Phe Leu Ile Pro Ser Val Pro Asp Pro Lys Ser Ile Phe	
260 265 270	
ccc ggg ctc ttt gag ata cac caa ggg aac ttc cag gag tgg atc aca	864
Pro Gly Leu Phe Glu Ile His Gln Gly Asn Phe Gln Glu Trp Ile Thr	
275 280 285	
gac acc cag aac gtg gcc cac ctc cac aag atg gca ggt gca gag caa	912
Asp Thr Gln Asn Val Ala His Leu His Lys Met Ala Gly Ala Glu Gln	
290 295 300	
gaa agt ggc ccc gag gag ccc ctg gta gtc cag ttg gcc aag act gaa	960
Glu Ser Gly Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Gln Leu Ala Lys Thr Glu	
305 310 315 320	
gcc gag tct ccc agg atg ctg gac cca cag acc gag gag aaa gag gcc	1008
Ala Glu Ser Pro Arg Met Leu Asp Pro Gln Thr Glu Glu Lys Glu Ala	
325 330 335	
tct ggg gga tcc ctc cag ctt ccc cac cag ccc ctc caa ggc ggt gat	1056
Ser Gly Gly Ser Leu Gln Leu Pro His Gln Pro Leu Gln Gly Gly Asp	
340 345 350	
gtg gtc aca atc ggg ggc ttc acc ttt gtg atg aat gac cgc tcc tac	1104
Val Val Thr Ile Gly Gly Phe Thr Phe Val Met Asn Asp Arg Ser Tyr	
355 360 365	
gtg gcg ttg gac tac aag gac gac gat gac aag tag	1140
Val Ala Leu <u>Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys</u>	
370 375 380	



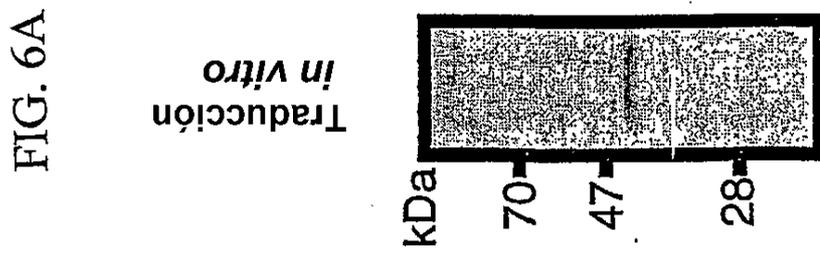
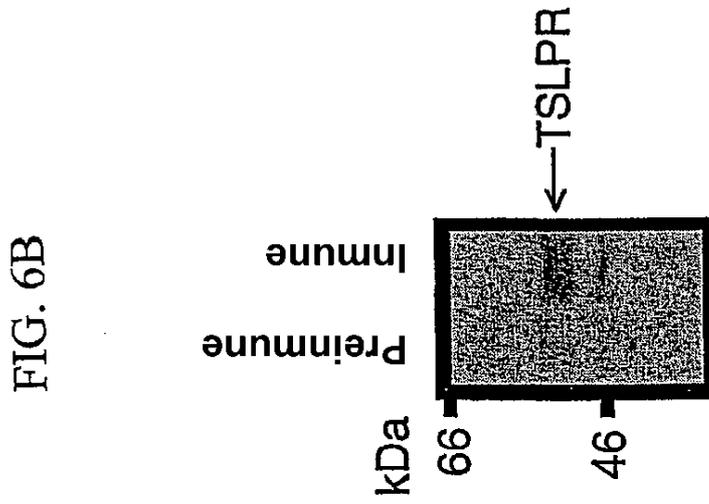
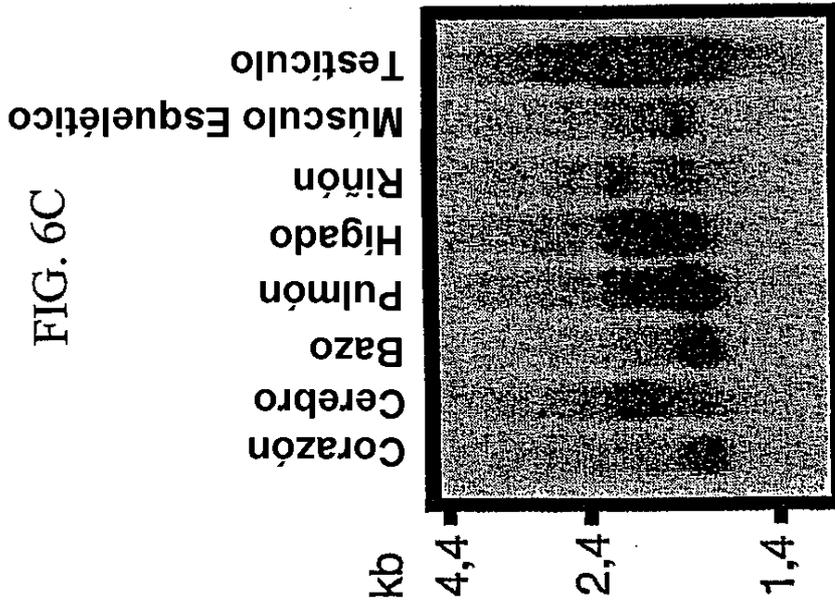


FIG. 7

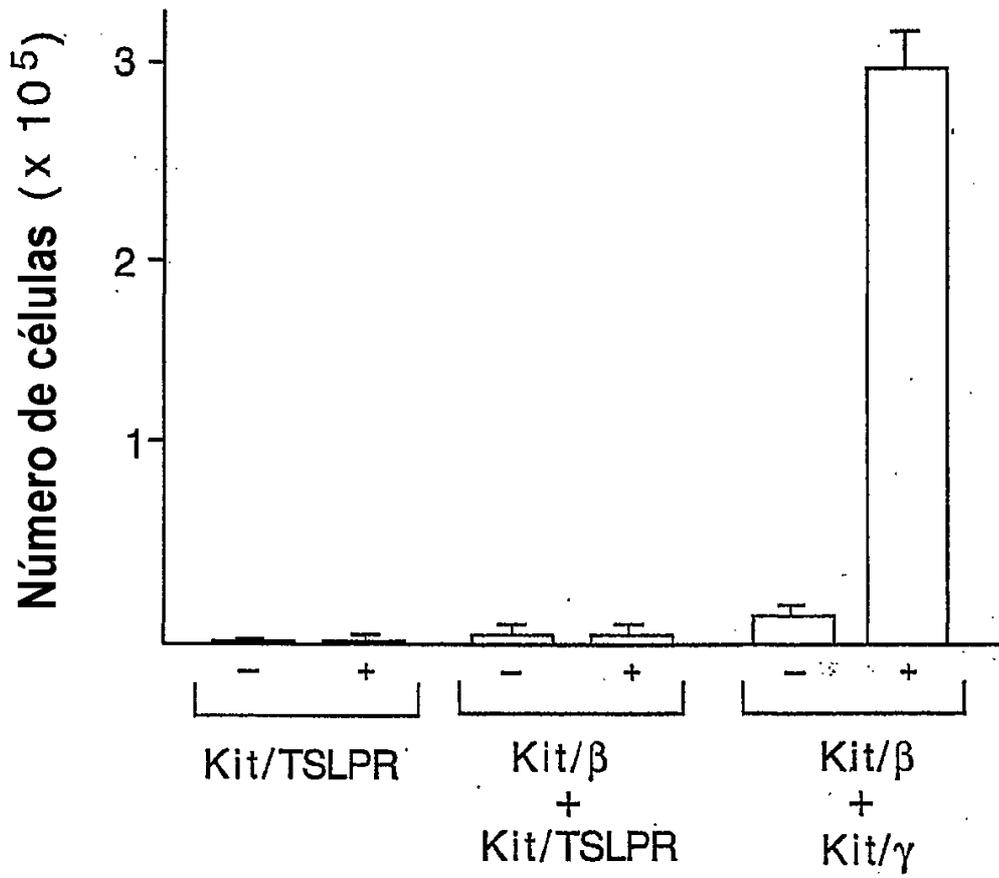


FIG. 8A

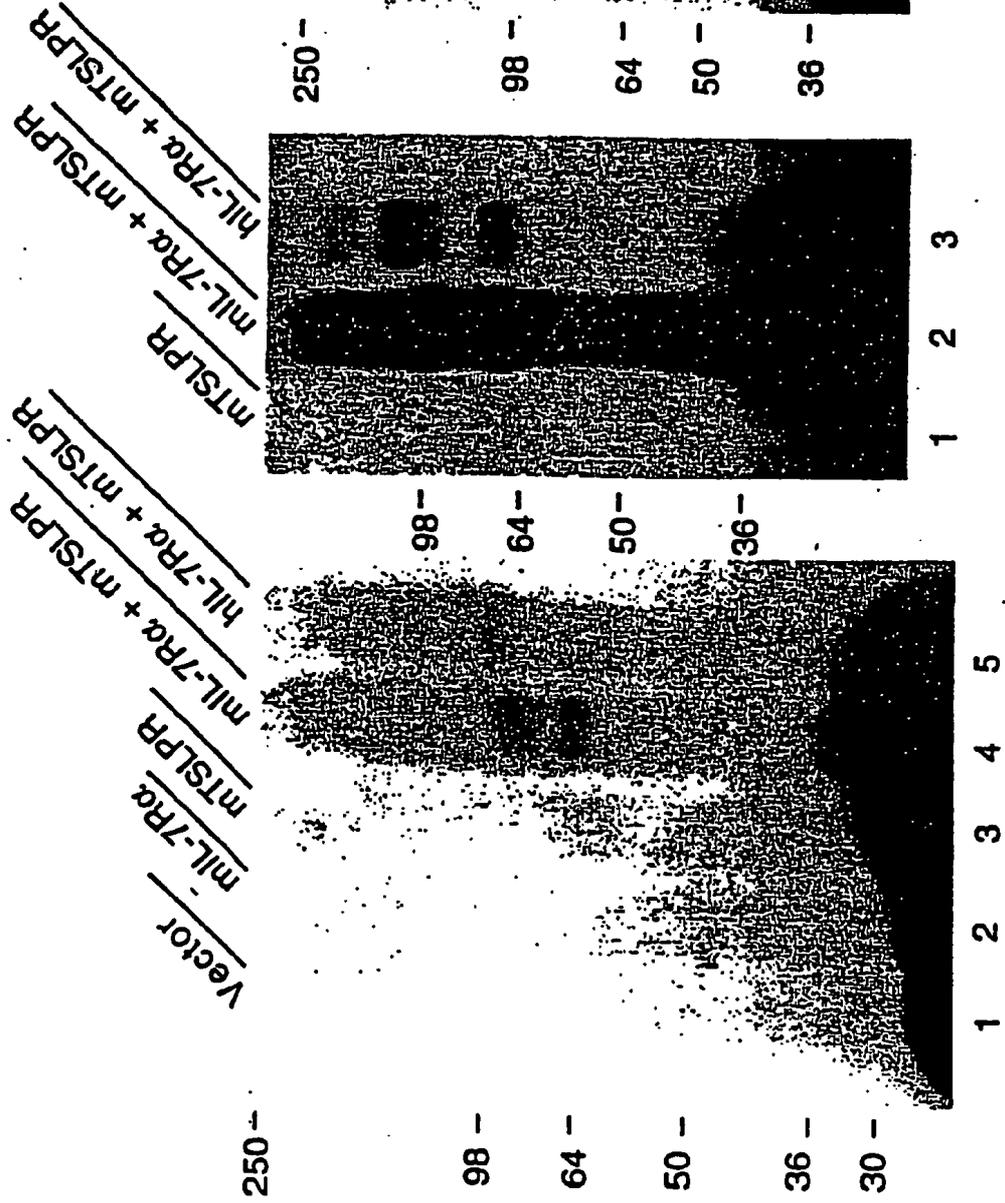


FIG. 8B

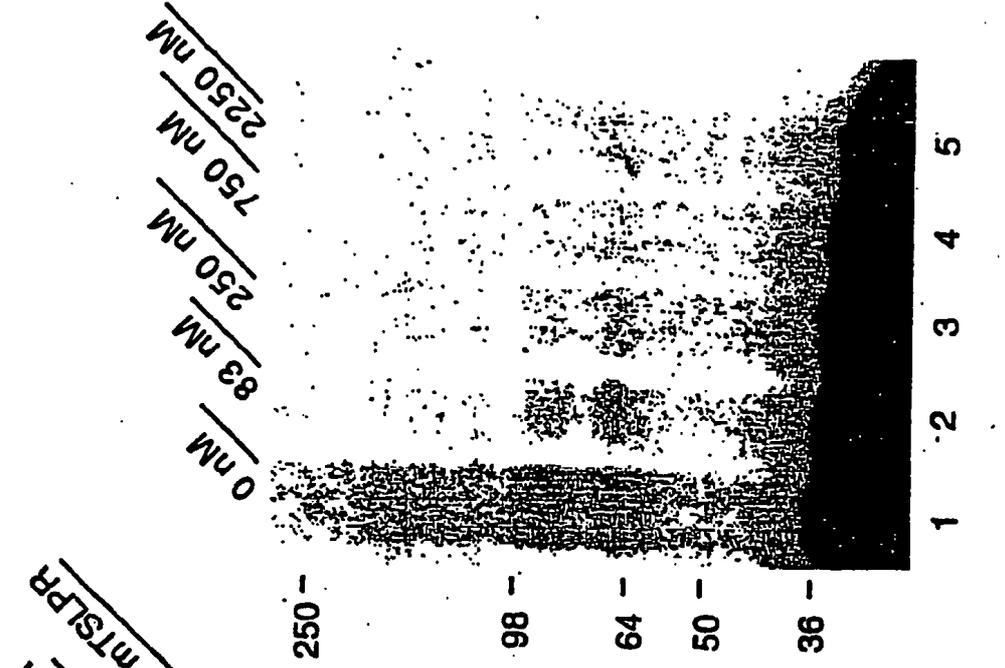


FIG. 8C

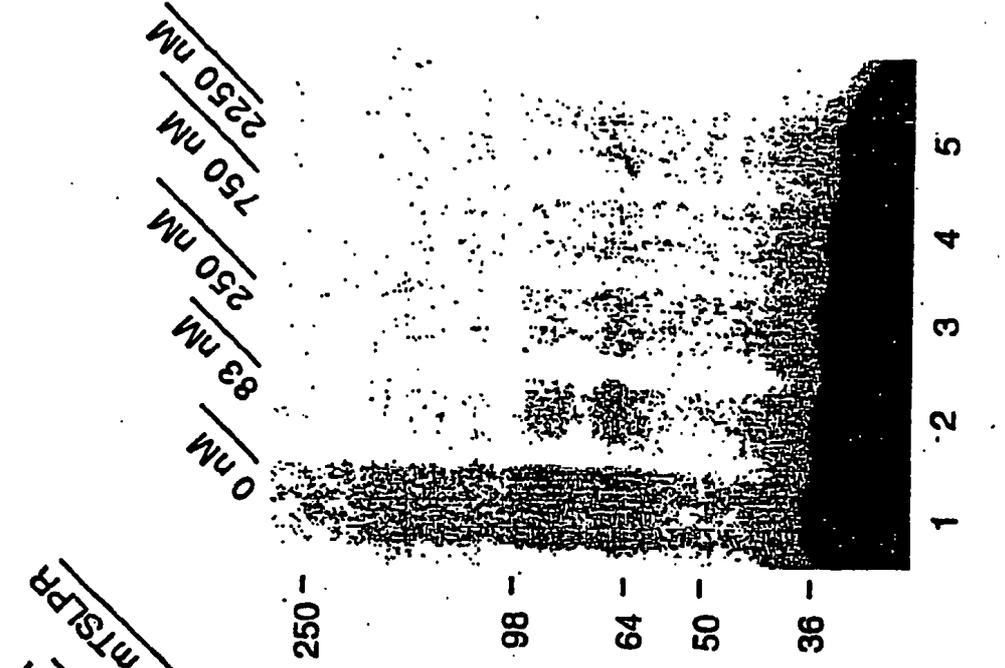


FIG. 9A

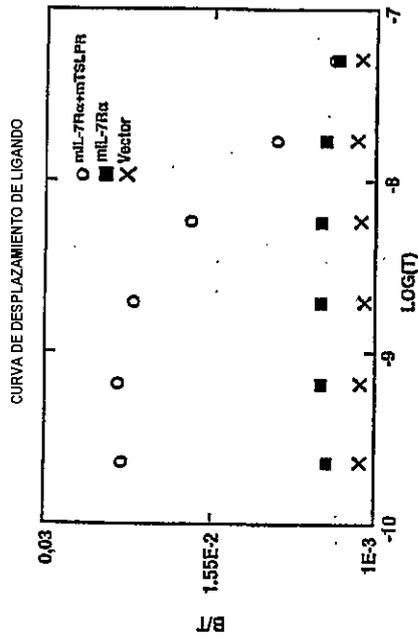


FIG. 9B

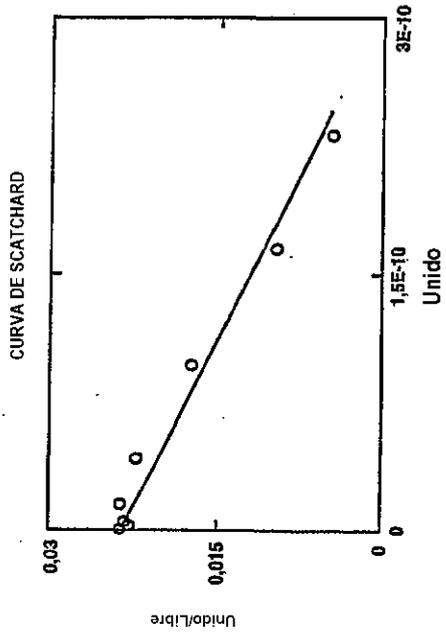


FIG. 9C

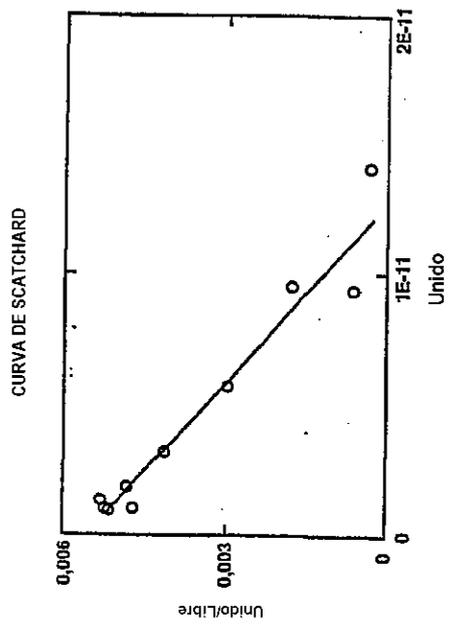


FIG. 9D

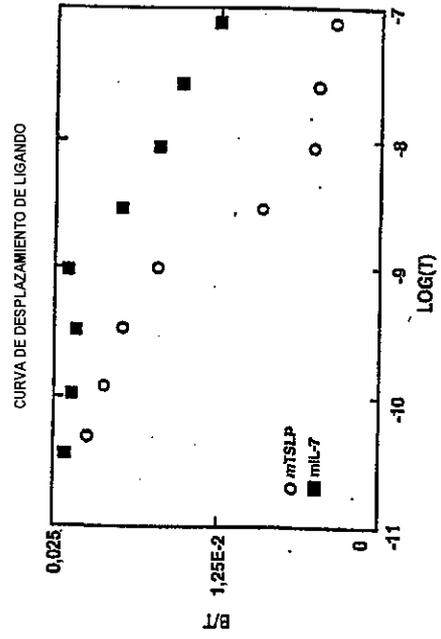


FIG. 10

