

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-519205

(P2004-519205A)

(43) 公表日 平成16年7月2日(2004.7.2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 P 37/02	4 B O 2 4
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 43/00	4 B O 2 9
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 O 5
	A 6 1 P 43/00	1 1 1
		4 B O 6 3
		4 B O 6 4
	審査請求 有	予備審査請求 有
		(全 212 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-505846 (P2002-505846)	(71) 出願人	500203709
(86) (22) 出願日	平成13年6月28日 (2001.6.28)		アムジェン インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月27日 (2002.12.27)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 913
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/020820		20, サウザンド オークス, ワン
(87) 国際公開番号	W02002/000724		アムジェン センター ドライブ
(87) 国際公開日	平成14年1月3日 (2002.1.3)	(74) 代理人	100062007
(31) 優先権主張番号	60/214,866		弁理士 川口 義雄
(32) 優先日	平成12年6月28日 (2000.6.28)	(74) 代理人	100105131
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 井上 満
		(74) 代理人	100113332
			弁理士 一入 章夫
		(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胸腺間質リンホポイエチンレセプター分子およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、胸腺間質リンホポイエチン (l y m p h o p o i e t i n) レセプター (T S L P R) ポリペプチドおよびこれをコードする核酸分子を提供する。本発明はまた、T S L P R ポリペプチドを産生するための、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞、および方法を提供する。本発明はさらに、T S L P R ポリペプチドに関連する疾患、障害、および状態の、診断、処置、改善、および/または予防のための、薬学的組成物および方法を提供する。T S L P R ポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト動物がまた、本発明に含まれる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 4、配列番号 7、配列番号 10、または配列番号 11 のいずれかに示されるヌクレオチド配列；

(b) 配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(c) (a) または (b) のいずれかの相補体に、中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；および

(d) (a) または (b) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

10

【請求項 2】

単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドに少なくとも約 70% 同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 配列番号 4、配列番号 7、配列番号 10、もしくは配列番号 11 のいずれか、または (a) に示されるヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードする、ヌクレオチド配列；

20

(c) 少なくとも約 25 アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 10、または配列番号 11 のいずれか、(a) または (b) のいずれかのヌクレオチド配列の領域であって、ここで、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号 5 もしくは配列番号 8 のいずれかに示されるコードされたポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、領域；

(d) 少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 10、もしくは配列番号 11 のいずれか、または (a) ~ (c) のいずれかのヌクレオチド配列の領域；

(e) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a) ~ (d) のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

30

(f) (a) ~ (d) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 3】

単離された核酸分子であって、以下；

(a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

40

(c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C 末端短縮および / または N 末端短縮を有する配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

50

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する配列番号5または配列番号8のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号5または配列番号8のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(f) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む(a) ~ (e) のいずれかのヌクレオチド配列；

(g) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で、(a) ~ (f) のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(h) (a) ~ (e) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、

からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

10

【請求項4】

請求項1、請求項2、または請求項3のいずれかに記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項5】

請求項4に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項6】

真核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項7】

原核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項8】

T S L P R ポリペプチドを産生するためのプロセスであって、該ポリペプチドを発現するために適切な条件下で請求項5に記載の宿主細胞を培養する工程、および必要に応じて、該培養物から該ポリペプチドを単離する工程を包含する、プロセス。

20

【請求項9】

請求項8に記載のプロセスによって産生される、ポリペプチド。

【請求項10】

請求項8に記載のプロセスであって、ここで、前記核酸分子が、T S L P R ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結された、ネイティブなT S L P R ポリペプチドに対するプロモーターDNA以外のプロモーターDNAを含む、プロセス。

【請求項11】

請求項2に記載の単離された核酸分子であって、ここで、同一性パーセントは、G A P、B L A S T N、F A S T A、B L A S T A、B L A S T X、B e s t F i t、およびS m i t h - W a t e r m a n アルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを用いて決定される、単離された核酸分子。

30

【請求項12】

化合物がT S L P R ポリペプチド活性またはT S L P R ポリペプチド産生を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項5、請求項6、または請求項7のいずれかに記載の細胞を該化合物に曝露する工程、および該細胞におけるT S L P R ポリペプチド活性またはT S L P R ポリペプチド産生を測定する工程を包含する、プロセス。

【請求項13】

配列番号5または配列番号8のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

40

【請求項14】

単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号6または配列番号9のいずれかに示され、必要に応じて、アミノ末端メチオニンをさらに含む、アミノ酸配列；

(b) 配列番号5または配列番号8のいずれかのオルソログに対するアミノ酸配列；

(c) 配列番号5または配列番号8のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号5または配列番号8のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

50

(d) 少なくとも約 25 アミノ酸残基を含む配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、該フラグメントは、配列番号 5 もしくは配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、フラグメント；ならびに

(e) 配列番号 5 または配列番号 8 のいずれか、または (a) ~ (c) のいずれかに示されるアミノ酸配列の、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 15】

単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列； 10

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C 末端短縮および/または N 末端短縮を有する配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに 20

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端短縮、および N 末端短縮からなる群より選択される少なくとも 1 つの改変を有する配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 16】

請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子によってコードされる単離されたポリペプチドであって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、単離されたポリペプチド。 30

【請求項 17】

請求項 14 に記載の単離されたポリペプチドであって、ここで、同一性パーセントは、GAP、BLASTP、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、および Smith-Waterman アルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを用いて決定される、単離されたポリペプチド。

【請求項 18】

請求項 13、請求項 14、または請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチドに特異的に結合する、選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項 19】

配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはそのフラグメントに特異的に結合する、請求項 18 に記載の選択的結合因子またはそのフラグメント。 40

【請求項 20】

抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 21】

ヒト化抗体である、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 22】

ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 23】

ポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子 50

。

【請求項 24】

モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子

。

【請求項 25】

キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 26】

C D R 移植抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 27】

抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。 10

【請求項 28】

可変領域フラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 29】

前記可変領域フラグメントが、F a b フラグメントまたは F a b ' フラグメントである、請求項 28 に記載の選択的結合因子。

【請求項 30】

配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異性を有する少なくとも 1 つの相補性決定領域を含む、選択的結合因子またはそのフラグメント 20

。

【請求項 31】

検出可能標識に結合される、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 32】

T S L P R ポリペプチドの生物学的活性を拮抗する、請求項 18 に記載の選択的結合因子

。

【請求項 33】

T S L P R ポリペプチド関連の疾患、状態、または障害を、処置、予防、または改善するための組成物であって、請求項 18 に記載の選択的結合因子を含む、組成物。

【請求項 34】

配列番号 5 または配列番号 8 のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドで動物を免疫 30
することによって産生される、選択的結合因子。

【請求項 35】

請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載のポリペプチドを結合し得る選択的結合因子を産生する、ハイブリドーマ。

【請求項 36】

請求項 18 に記載の抗 T S L P R 抗体またはフラグメントを用いて、T S L P R ポリペプチドの量を検出または定量する方法。

【請求項 37】

請求項 13、請求項 14、または請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチド、および薬 40
学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項 38】

前記薬学的に受容可能な処方剤が、キャリア、アジュバント、溶解剤、安定剤、または抗酸化剤である、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 39】

前記ポリペプチドが、配列番号 6 または配列番号 9 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 40】

請求項 13、請求項 14、または請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチドの誘導体を含む、ポリペプチド。

【請求項 41】

水溶性ポリマーを用いて共有結合的に改変された、請求項 40 に記載のポリペプチド。

【請求項 42】

請求項 41 に記載のポリペプチドであって、ここで、前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ-(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、およびポリビニルアルコールからなる群より選択される、ポリペプチド。

【請求項 43】

請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

10

【請求項 44】

前記核酸分子が、ウイルスベクター中に含まれる、請求項 43 に記載の組成物。

【請求項 45】

請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子を含む、ウイルスベクター。

【請求項 46】

異種アミノ酸配列に融合された、請求項 13、請求項 14、または請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチドを含む、融合ポリペプチド。

【請求項 47】

前記異種アミノ酸配列が、IgG 定常ドメインまたはそのフラグメントである、請求項 46 に記載の融合ポリペプチド。

20

【請求項 48】

医学状態を、処置、予防、または改善するための組成物であって、請求項 13、請求項 14、もしくは請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチド、または請求項 1、請求項 2、もしくは請求項 3 のいずれかに記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む、組成物。

【請求項 49】

被験体における病的状態または病的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：
(a) サンプル中の、請求項 13、請求項 14、もしくは請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチド、または請求項 1、請求項 2、もしくは請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子によってコードされるポリペプチドの、発現の存在または発現量を決定する工程；および

30

(b) 該ポリペプチドの発現の存在または発現量に基づいて、病的状態または病的状態に対する感受性を診断する工程、
を包含する、方法。

【請求項 50】

デバイスであって、以下：

(a) 移植に適した膜；および

(b) 該膜内にカプセル化された細胞であって、該細胞は、請求項 13、請求項 14、もしくは請求項 15 のいずれかに記載のタンパク質を分泌する、細胞；を備え、
該膜は、該タンパク質に対して透過性であり、そして該細胞に有害な物質に対して不透過性である、デバイス。

40

【請求項 51】

TSLPR ポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、以下：

(a) 請求項 13、請求項 14、もしくは請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチドを、化合物と接触させる工程；および

(b) 該化合物に対する該 TSLPR ポリペプチドの結合の程度を決定する工程、
を包含する、方法。

【請求項 52】

前記化合物に結合した場合に、前記ポリペプチドの活性を決定する工程をさらに包含する

50

、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

動物においてポリペプチドのレベルを調節する組成物であって、請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子を含む、組成物。

【請求項 5 4】

請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【請求項 5 5】

化合物が T S L P R ポリペプチド活性または T S L P R ポリペプチド産生を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項 5 4 に記載のトランスジェニック哺乳動物を該化合物に曝露する工程、および該哺乳動物における T S L P R ポリペプチド活性または T S L P R ポリペプチド産生を測定する工程を包含する、プロセス。

10

【請求項 5 6】

固体支持体に結合する、請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 5 7】

請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの核酸分子を含む、核酸分子のアレイ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本願は、2000年6月28日出願の米国仮特許出願第60/214,866号からの優先権の利益を主張し、この仮出願の開示は、本明細書中で参考として明確に援用される。

20

【0002】

(発明の分野)

本発明は、胸腺間質リンホポイエチン(Lymphopoeitin)レセプター(T S L P R)ポリペプチドおよびこのポリペプチドをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、T S L P R ポリペプチドを産生するための、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞および方法に関する。本発明はさらに、T S L P R ポリペプチドと関連する疾患、障害、および状態の、診断、処置、改善、および/または予防のための薬学的組成物および方法に関する。

30

【0003】

(発明の背景)

核酸分子の同定、クローニング、発現、および操作における技術進歩ならびにヒトゲノムの解読は、新規治療剤の発見を大きく加速した。現在、高速核酸配列決定技術は、前例のない速度で配列情報を作製し得、そしてコンピュータ分析と合わされて、ゲノムの一部および全体へと重複配列を集合すること、ならびにポリペプチドコード領域の同定を可能にする。既知アミノ酸配列のデータベース編集物に対する推定アミノ酸配列の比較は、以前に同定された配列および/または構造の目印に対して相同性の程度を決定することを可能にする。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングおよび発現は、構造分析および機能分析のためのポリペプチド産物を提供する。核酸分子およびコードされるポリペプチドの操作は、治療剤としての使用に関して生成物に対して有利な特性を与え得る。

40

【0004】

過去10年間にわたるゲノム研究における有意な技術進歩にも関わらず、ヒトゲノムに基づく新規治療剤の開発に関する可能性は、未だほとんど実現されていない。潜在的に有利なポリペプチド治療剤をコードする多くの遺伝子またはこれらがコードするポリペプチド(これらは、治療分子に対して「標的」として働き得る)は、未だ同定されていない。従って、診断的な利点または治療的な利点を有する、新規ポリペプチドおよびこれらをコードする核酸分子を同定することが、本発明の目的である。

【0005】

サイトカインは、増殖、分化、および生存を含む種々の細胞性応答を調節する。種々のク

50

ラスのサイトカインの中の1つが、I型サイトカインであり、これは、アップ-アップ-ダウン-ダウントポロジを示す4つのヘリックス束の構造を形成する(Bazan, 1990, Immunol. Today 11:350-54; LeonardおよびO'Shea, 1998, Annu. Rev. Immunol. 16:293-322; Leonard, Fundamental Immunology 741-74 (Paul編, Lippincott Raven Publishers 第4編, 1999年))。I型サイトカインとしては、多数のインターロイキン(例えば、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、およびIL-15)、ならびにGM-CSF、エリトロポイエチン、 trombopoietin)のような血液学的に活性な他の分子、なら

10

びに成長ホルモンおよびプロラクチンのような分子が挙げられる。I型サイトカインによるシグナル伝達は、I型サイトカインレセプタースーパーファミリーのホモ二量体、ヘテロ二量体、またはより高次の他のレセプターオリゴマーとの相互作用を含む。リガンド結合は、二量体化またはより高次のオリゴマー形成を誘導し、下流のシグナル伝達(Jak-STAT経路(Bazan、前出; LeonardおよびO'Shea、前出; Leonard、前出)に部分的に関与する)を生じる。

【0006】

胸腺間質リンホポイエチン(TSLP)は、生物学的活性がIL-7の生物学的活性と重複するサイトカインである。例えば、TSLPおよびIL-7は、転写因子Stat5のチロシンリン酸化を誘導する(Isaksenら、1999、J. Immunol. 163:5971-77)。TSLP活性は、胎仔肝臓の造血前駆細胞からのマウスIgM⁺B細胞の発生を支持する胸腺間質細胞株の馴化培地中で元々同定された(Friendら、1994 Exp. Hematol. 22:321-28)。さらに、TSLPは、長期の骨髄培養物中でB細胞リンパ球産生を促進し得、そして胸腺細胞および成熟T細胞の両方を同時刺激し得る(Friendら、前出; Levinら、1999、J. Immunol. 162:677-83)。TSLPはまた、T細胞レセプター座位を特異的に再配列するための外因性シグナルとして機能し得る(Candellasら、1997、Immunol. Lett. 57:9-14)。従って、TSLPのためのサイトカインレセプターの単離および特徴付けは、TSLP関連疾患またはTSLP関連状態の処置において有用な化合物(例えば、B細胞発生、T細胞発生、T細胞レセプター遺伝子再配列、

20

またはStat5転写因子の調節に影響する化合物)の同定を可能にする。

30

【0007】

(発明の要旨)

本発明は、新規TSLPR核酸分子およびコードされるポリペプチドに関する。

【0008】

本発明は、単離された核酸分子を提供し、この核酸分子は、以下：

(a) 配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10、または配列番号11のいずれかに示される、ヌクレオチド配列；

(b) 配列番号2、配列番号5、または配列番号8のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

40

(c) (b)または(c)のいずれかの相補体に、中程度にストリンジェントな条件下または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；および

(d) (b)または(c)のいずれかと相補的な、ヌクレオチド配列、

からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0009】

本発明はまた、単離された核酸分子を提供し、この核酸分子は、

(a) 配列番号2、配列番号5、または配列番号8のいずれかに示されるポリペプチドと少なくとも約70%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号2、配列番号5、または配列番号8のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

50

(b) 配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 10、もしくは配列番号 11 のいずれかに示されるヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体、または (a) の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードする、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも約 25 アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 10、もしくは配列番号 11 のいずれかのヌクレオチド配列の領域、(a) のヌクレオチド配列の領域または (b) のヌクレオチド配列の領域であって、ここで、上記ポリペプチドフラグメントは、配列番号 2、配列番号 5、もしくは配列番号 8 のいずれかに示されるコードされたポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、ヌクレオチド配列の領域；

(d) 少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、配列番号 10、または配列番号 11 のいずれかのヌクレオチド配列の領域、または (a) ~ (c) のいずれかのヌクレオチド配列の領域；

(e) 中程度にストリンジェントな条件下または高度にストリンジェントな条件下で、(a) ~ (d) のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(f) (a) ~ (d) のいずれかと相補的な、ヌクレオチド配列、
からなる群より選択される、ヌクレオチド配列を含む。

【0010】

本発明はさらに、単離された核酸分子を提供し、この核酸分子は、

(a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 5、配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C 末端短縮および/または N 末端短縮を有する、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端短縮、および N 末端短縮からなる群より選択される少なくとも 1 つの改変を有する、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(f) 少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む、(a) ~ (e) のいずれかの、ヌクレオチド配列；

(g) 中程度にストリンジェントな条件下または高度にストリンジェントな条件下で、(a) ~ (f) のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(h) (a) ~ (e) のいずれかと相補的な、ヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0011】

本発明は、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドを提供する。

【0012】

本発明はまた、単離されたポリペプチドを提供し、このポリペプチドは、

10

20

30

40

50

(a) 配列番号 3、配列番号 6、または配列番号 9 に示されるアミノ酸配列であって、必要に応じてさらにアミノ末端メチオニンを含む、アミノ酸配列；

(b) 配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかのオルソログについての、アミノ酸配列；

(c) 配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかのアミノ酸配列と少なくとも約 70% 同一であるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) 少なくとも約 25 アミノ酸残基を含む、配列番号 2、配列番号 5、もしくは配列番号 8 のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、上記フラグメントは、配列番号 2、配列番号 5、もしくは配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、フラグメント；ならびに

(e) 配列番号 2、配列番号 5、もしくは配列番号 8 のいずれかに示されるアミノ酸配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、または (a) ~ (c) のいずれかの対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0013】

本発明はさらに、単離されたポリペプチドを提供し、このポリペプチドは、

(a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C 末端短縮および/または N 末端短縮を有する、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端短縮、および N 末端短縮からなる群より選択される少なくとも 1 つの改変を有する、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 5、または配列番号 8 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0014】

T S L P R アミノ酸配列を含む融合ポリペプチドもまた、提供される。

【0015】

本発明はまた、本明細書中に示されるような単離された核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に示されるような組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、および T S L P R ポリペプチドを産生する方法を提供し、この方法は、この宿主細胞を培養する工程、および必要に応じてそのように産生されたポリペプチドを単離する工程を包含する。

【0016】

T S L P R ポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト動物もまた、本発明に含まれる。T S L P R 核酸分子は、T S L P R ポリペプチドの発現および T

10

20

30

40

50

S L P R ポリペプチドの増加したレベル（これは、増加した循環レベルを含み得る）を可能にする様式で、動物中に導入される。あるいは、T S L P R 核酸分子は、内因性 T S L P R ポリペプチドの発現を阻害する（すなわち、T S L P R ポリペプチド遺伝子ノックアウトを保有するトランスジェニック動物を作製する）様式で動物に導入される。このトランスジェニック非ヒト動物は、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはげっ歯類（例えば、ラットまたはマウス）である。

【0017】

本発明の T S L P R ポリペプチドの誘導体もまた、提供される。

【0018】

本発明の T S L P R ポリペプチドに特異的に結合し得る選択的結合因子（例えば、抗体およびペプチド）が、さらに提供される。このような抗体およびペプチドは、アゴニストであってもアンタゴニストであってもよい。

10

【0019】

本発明のヌクレオチド、ポリペプチド、もしくは選択的結合因子と、1つ以上の薬学的に受容可能な処方剤とを含む、薬学的組成物もまた、本発明によって包含される。この薬学的組成物は、治療有効量の本発明のヌクレオチドまたはポリペプチドを提供するために使用される。本発明はまた、このポリペプチド、核酸分子、および選択的結合因子を使用する方法に関する。

【0020】

本発明の T S L P R ポリペプチドおよび T S L P R 核酸分子は、疾患および障害（本明細書中に列挙されるものを含む）を処置、予防、改善、および/または検出するために使用され得る。

20

【0021】

本発明はまた、T S L P R ポリペプチドに結合する試験分子を同定するために、試験分子をアッセイする方法を提供する。この方法は、T S L P R ポリペプチドを試験分子と接触させて、このポリペプチドへのこの試験分子の結合の程度を決定する工程を包含する。この方法はさらに、このような試験分子が、T S L P R ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを決定する工程を包含する。本発明はさらに、T S L P R ポリペプチドの発現または T S L P R ポリペプチドの活性に対する分子の影響を試験する方法を提供する。

30

【0022】

T S L P R ポリペプチドの発現を調整する方法および T S L P R ポリペプチドのレベルを調節する（すなわち、増加または減少させる）方法もまた、本発明によって包含される。1つの方法は、T S L P R ポリペプチドをコードする核酸分子を動物に投与する工程を包含する。別の方法において、T S L P R ポリペプチドの発現を調整または調節するエレメントを含む核酸分子が、投与され得る。これらの方法の例としては、本明細書中にさらに記載されるような、遺伝子治療、細胞治療、およびアンチセンス治療が挙げられる。

【0023】

（発明の詳細な説明）

本明細書中で使用される節の表題は、組織的な目的のみのためであり、そして記載される主題を限定するようには解釈されるべきではない。本願において引用される全ての参考文献は、明確に本明細書中に参考として援用される。

40

【0024】

（定義）

用語「T S L P R 遺伝子」または「T S L P R 核酸分子」また「T S L P R ポリヌクレオチド」とは、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10、または配列番号11のいずれかに示されるヌクレオチド配列、配列番号2、配列番号5、または配列番号8のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、および本明細書中で定義される核酸分子を含むかまたはこれらからなる、核酸分子をいう。

【0025】

50

用語「T S L P Rポリペプチド対立遺伝子改変体」とは、生物または生物の集団の染色体上の所定の遺伝子座を占める遺伝子の、天然に存在する可能ないくつかの代替形態のうちの1つをいう。

【0026】

用語「T S L P Rポリペプチドスプライス改変体」とは、配列番号2、配列番号5、または配列番号8のいずれかに示されるT S L P Rポリペプチドアミノ酸配列のRNA転写物中のイントロン配列の選択的プロセッシングによって生成される、核酸分子（通常はRNA）をいう。

【0027】

用語「単離された核酸分子」とは、(1)総核酸が供給源細胞から単離される場合に、とも天然で見出されるタンパク質、脂質、糖質、または他の物質のうち少なくとも約50パーセントから分離された、本発明の核酸分子、(2)「単離された核酸分子」が天然で連結しているポリヌクレオチドの全てまたは一部に連結していない、本発明の核酸分子、(3)天然では連結しないポリヌクレオチドに作動可能に連結されている、本発明の核酸分子、または(4)より大きなポリヌクレオチド配列の一部として天然には存在しない、本発明の核酸分子をいう。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、いかなる他の夾雑核酸分子、または天然の環境において見出される他の夾雑物（これらは、ポリペプチド産生における使用、または治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる）も実質的には含まない。

10

【0028】

用語「核酸配列」または「核酸分子」は、DNA配列またはRNA配列をいう。この用語は、DNAおよびRNAの公知の塩基アナログのうちいずれかから形成される分子を含み、この塩基アナログは、例えば、以下であるがこれらに限定されない：4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニル-シトシン、プソイドイソシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソ-ペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノ-メチル-2-チオウラシル、β-D-マンノシルキユーオシン(beta-D-mannosyl queosine)、5'-メトキシカルボニル-メチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシプトキソシン、プソイドウラシル、キユーオシン(queosine)、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、プソイドウラシル、キユーオシン(queosine)、2-チオシトシン、および2,6-ジアミノプリン。

20

30

【0029】

用語「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を移すために使用される任意の分子（例えば、核酸、プラスミド、またはウイルス）をいうために使用される。

40

【0030】

用語「発現ベクター」は、宿主細胞の形質転換に適切であり、かつ挿入された異種核酸配列の発現を、指向および/または制御する核酸配列を含む、ベクターをいう。発現としては、転写、翻訳、およびRNAスプライシング（イントロンが存在する場合）のようなプロセスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0031】

用語「作動可能に連結された(されている)」は、隣接配列の配置方法をいうために本明細書中に使用される。ここで、このように記載される隣接配列は、その通常の機能を実行

50

するように構成されるかまたは集合される。従って、コード配列に作動可能に連結された隣接配列は、そのコード配列の複製、転写および/または翻訳をもたらすことができ得る。例えば、プロモーターがコード配列の転写を指向し得る場合、このコード配列は、このプロモーターに作動可能に連結されている。隣接配列は、それが正確に機能する限り、コード配列と連続している必要はない。従って、例えば、翻訳されないが転写される介在配列が、プロモーター配列とこのコード配列との間に存在し得、そして、このプロモーター配列はなお、このコード配列に「作動可能に連結されている」とみなされ得る。

【0032】

用語「宿主細胞」は、核酸配列で形質転換されたかまたは形質転換され得、次いで目的の選択された遺伝子を発現し得る、細胞をいうために用いられる。この用語は、この選択された遺伝子が存在する限り、子孫が形態学または遺伝的構成においてもとの親と同一であってもなくても、この親細胞の子孫を含む。

10

【0033】

用語「T S L P Rポリペプチド」とは、配列番号2、配列番号5、または配列番号8のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドおよび関連ポリペプチドをいう。関連ポリペプチドとしては、以下が挙げられる：T S L P Rポリペプチドフラグメント、T S L P Rポリペプチドオルソログ、T S L P Rポリペプチド改変体、およびT S L P Rポリペプチド誘導体であって、配列番号2、配列番号5、または配列番号8のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を有するもの。T S L P Rポリペプチドは、本明細書中に定義されるように、成熟ポリペプチドであり得、そして調製方法によっては、アミノ末端メチオニン残基を有しても有さなくてもよい。

20

【0034】

用語「T S L P Rポリペプチドフラグメント」とは、配列番号2、配列番号5、または配列番号8のいずれかに示されるポリペプチドのアミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）の短縮および/またはカルボキシル末端の短縮を含むポリペプチドをいう。用語「T S L P Rポリペプチドフラグメント」とはまた、T S L P Rポリペプチドオルソログ、T S L P Rポリペプチド誘導体、またはT S L P Rポリペプチド改変体のアミノ末端および/またはカルボキシル末端の短縮物をいうか、あるいはT S L P Rポリペプチド対立遺伝子改変体またはT S L P Rポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端および/またはカルボキシル末端の短縮物をいう。T S L P Rポリペプチドフラグメントは、選択的RNAスプライシングから生じ得るか、またはインビボプロテアーゼ活性から生じ得る。T S L P Rポリペプチドの膜結合形態もまた、本発明によって意図される。好ましい実施形態において、短縮および/または欠失は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または100アミノ酸より多いアミノ酸を含む。このように産生されたポリペプチドフラグメントは、約25個連続するアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約200アミノ酸を含む。このようなT S L P Rポリペプチドフラグメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。このようなフラグメントは、例えば、T S L P Rポリペプチドに対する抗体を生成するために用いられ得ることが理解される。

30

40

【0035】

用語「T S L P Rポリペプチドオルソログ」とは、配列番号2、配列番号5、または配列番号8のいずれかに示されるT S L P Rポリペプチドアミノ酸配列に対応する、別の種由来のポリペプチドをいう。例えば、マウスおよびヒトのT S L P Rポリペプチドは、互いにオルソログであるとみなされる。

【0036】

用語「T S L P Rポリペプチド改変体」とは、配列番号2、配列番号5、または配列番号8のいずれかに示されるT S L P Rポリペプチドアミノ酸配列（リーダー配列を有するか、または有さない）に比べて、1つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失（例えば、内部欠失および/もしくはT S L P Rポリペプチドフラグメント）、ならびに/または付加（例え

50

ば、内部付加および/もしくはT S L P R融合ポリペプチド)を有するアミノ酸配列を含む、T S L P Rポリペプチドをいう。変体は、天然に存在し得る(例えば、T S L P Rポリペプチド対立遺伝子変体、T S L P Rポリペプチドオルソログ、およびT S L P Rスプライス変体)か、または人工的に構築され得る。このようなT S L P R - ポリペプチド変体は、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10、または配列番号11のいずれかに示されるDNA配列からしかるべく変動するDNA配列を有する対応する核酸分子から調製され得る。好ましい実施形態において、この変体は、1~3個、または1~5個、または1~10個、または1~15個、または1~20個、または1~25個、または1~50個、または1~75個、または1~100個、または100個よりも多いアミノ酸の置換、挿入、付加および/もしくは欠失を有し、ここでその置換は、保存的であっても、または非保存的であってもよいし、あるいはその組み合わせであってもよい。

10

【0037】

用語「T S L P Rポリペプチド誘導体」とは、化学的に改変された、本明細書中に定義されるような、配列番号2、配列番号5、もしくは配列番号8のいずれかに示されるポリペプチド、T S L P Rポリペプチドフラグメント、T S L P Rポリペプチドオルソログ、またはT S L P Rポリペプチド変体をいう。用語「T S L P Rポリペプチド誘導体」とはまた、化学的に改変された、本明細書中に定義されるような、T S L P Rポリペプチド対立遺伝子変体またはT S L P Rポリペプチドスプライス変体によってコードされるポリペプチドをいう。

20

【0038】

用語「成熟T S L P Rポリペプチド」とは、リーダー配列を欠くT S L P Rポリペプチドをいう。成熟T S L P Rポリペプチドはまた、アミノ末端(リーダー配列を有するか、または有さない)および/またはカルボキシル末端のタンパク質分解性プロセッシング、より大きい前駆体からのより小さいポリペプチドの切断、N結合型グリコシル化および/またはO結合型グリコシル化などのような、他の改変を含み得る。例示的な成熟T S L P Rポリペプチドは、配列番号3、配列番号6、または配列番号9のいずれかのアミノ酸配列によって示される。

【0039】

用語「T S L P R融合ポリペプチド」とは、本明細書中に定義されるような、配列番号2、配列番号5、または配列番号8のいずれかに示されるポリペプチド、T S L P Rポリペプチドフラグメント、T S L P Rポリペプチドオルソログ、T S L P Rポリペプチド変体、またはT S L P Rポリペプチド誘導体の、アミノ末端またはカルボキシル末端での1つ以上のアミノ酸(例えば、異種タンパク質または異種ペプチド)の融合体をいう。用語「T S L P R融合ポリペプチド」とはまた、本明細書中に定義されるような、T S L P Rポリペプチド対立遺伝子変体またはT S L P Rポリペプチドスプライス変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端での、1つ以上のアミノ酸の融合体をいう。

30

【0040】

用語「生物学的に活性なT S L P Rポリペプチド」とは、配列番号2、配列番号5、または配列番号8のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドの少なくとも1つの活性の特徴を有する、T S L P Rポリペプチドをいう。さらに、T S L P Rポリペプチドは、免疫原として活性であり得る;すなわち、このT S L P Rポリペプチドは、抗体が惹起され得る少なくとも1つのエピトープを含む。

40

【0041】

用語「単離されたポリペプチド」とは、以下のような本発明のポリペプチドをいう:(1)供給源細胞から単離された場合に、共に天然に見出されるポリヌクレオチド、脂質、糖質、または他の材料の、少なくとも約50%から分離されたポリペプチド、(2)その「単離されたポリペプチド」が天然において結合されているポリペプチドの全体または一部分に(共有結合性の相互作用または非共有結合性の相互作用によって)結合されていない

50

ポリペプチド、(3)天然において結合されないポリペプチドに(共有結合性の相互作用または非共有結合性の相互作用によって)作動可能に連結されているポリペプチド、あるいは(4)天然に存在しないポリペプチド。好ましくは、この単離されたポリペプチドは、その治療用途、診断用途、予防用途または研究用途を妨害する、その天然の環境において見出されるいかなる他の夾雑ポリペプチドまたは他の夾雑物をも実質的に含まない。

【0042】

用語「同一性(identity)」は、当該分野で公知のように、2つ以上のポリペプチド分子、または2つ以上の核酸分子の配列の間にある、これらの配列を比較することによって決定される、関係をいう。当該分野では、「同一性」はまた、核酸分子またはポリペプチドの配列関連性の程度(場合によっては、2つ以上のヌクレオチド配列または2つ以上のアミノ酸配列のストリングの間的一致により決定され得る)を意味する。「同一性」は、特定の算術モデルまたはコンピュータープログラム(すなわち、アルゴリズム)によって位置付けられた、ギャップアライメント(もし存在するならば)を有する2つ以上の配列のうちの短い方の間の同一適合のパーセントを測定する。

10

【0043】

用語「類似性(similarity)」は、関連する概念であるが、「同一性」とは対照的に、「類似性」とは、同一適合および保存的置換適合の両方を含む関連性の尺度をいう。2つのポリペプチド配列が、例えば、10/20の同一のアミノ酸を有し、そして残りが全て非保存的置換であるならば、同一性パーセントおよび類似性パーセントは、両方とも50%である。同じ例で、保存的置換が存在するさらに5つの位置が存在するならば、同一性パーセントは、50%のままであるが、類似性パーセントは75%(15/20)である。従って、保存的置換が存在する場合、2つのポリペプチドの間の類似性パーセントは、これらの2つのポリペプチドの間の同一性パーセントよりも高い。

20

【0044】

用語「天然に存在する」または「ネイティブ」は、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞などのような生物学的材料に関して使用される場合、天然に見出されかつ人工的に操作されていない材料をいう。同様に、「天然に存在しない」または「非ネイティブ」は、本明細書中において使用される場合、天然には見出されないか、または人工的に構造改変されたかもしくは合成された、材料をいう。

【0045】

用語「有効量」および「治療的に有効な量」とは、各々、本明細書中に示されるTSLPRポリペプチドの1つ以上の生物学的活性の観察可能なレベルを支持するために使用されるTSLPRポリペプチドまたはTSLPR核酸分子の量をいう。

30

【0046】

本明細書中に使用される場合、用語「薬学的に受容可能なキャリア」または「生理学的に受容可能なキャリア」とは、薬学的組成物としてのTSLPRポリペプチド、TSLPR核酸分子、またはTSLPR選択的結合因子の送達を、達成するかまたは増強するのに適切な、1つ以上の処方材料をいう。

【0047】

用語「抗原」とは、選択的結合因子(例えば、抗体)により結合され得る分子または分子の一部であって、そしてさらに、その抗原のエピトープに結合し得る抗体を産生するために動物において用いられ得る、分子または分子の一部をいう。抗原は、1つ以上のエピトープを有し得る。

40

【0048】

用語「選択的結合因子」とは、TSLPRポリペプチドに対して特異性を有する分子(単数または複数)をいう。本明細書中にて使用される場合、用語「特異的」および「特異性」とは、ヒトTSLPRポリペプチドに結合するがヒト非TSLPRポリペプチドに結合しない、選択的結合因子の能力をいう。しかし、その選択的結合因子が、配列番号2、配列番号5、または配列番号8のいずれかに示されるようなポリペプチドのオルソログ(すなわち、その種間のバージョン(例えば、マウスTSLPRポリペプチドおよびラットT

50

S L P Rポリペプチド))もまた結合し得ることが、理解される。

【0049】

用語「形質導入」は、1つの細菌から別のものへの(通常、ファージによる)遺伝子の移入をいうために使用される。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核生物細胞の配列の捕捉および移入をいう。

【0050】

用語「トランスフェクション」は、細胞による外来DNAまたは外因性DNAの取り込みをいうために使用される。そして、細胞は、その外因性DNAが細胞膜の内側に導入されている場合、「トランスフェクト」されている。多数のトランスフェクション技術が、当該分野で周知であり、そして、本明細書中に開示される。例えば、Grahamら、1973, *Virology* 52:456; Sambrookら、*Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davisら、*Basic Methods in Molecular Biology* (Elsevier, 1986); およびChuら、1981, *Gene* 13:197を参照のこと。このような技術は、1つ以上の外因性DNA部分を適切な宿主細胞に導入するために使用され得る。

10

【0051】

用語「形質転換」は、本明細書中に使用される場合、細胞の遺伝特徴における変化をいい、そして細胞は、新しいDNAを含むように改変されている場合、形質転換されている。例えば、細胞は、そのネイティブな状態から遺伝的に改変された場合、形質転換されている。トランスフェクションまたは形質導入に続いて、その形質転換DNAは、細胞の染色体へ物理的に組み込むことによってその細胞のDNAと組み換わり得るか、複製されないエピソードエレメントとして一過性に維持され得るか、またはプラスミドとして独立して複製し得る。細胞は、そのDNAが細胞の分裂と共に複製される場合、安定に形質転換されているとみなされる。

20

【0052】

(核酸分子および/またはポリペプチドの関連性)

関連する核酸分子が、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10、または配列番号11のいずれかの核酸分子の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体を含み、そして上記のヌクレオチド配列のいずれかと相補的である配列を含むことが、理解される。関連する核酸分子はまた、配列番号2、配列番号5、または配列番号8のいずれかのポリペプチドと比較して、1つ以上のアミノ酸残基の置換、改変、付加、および/もしくは欠失を含むかまたはこれらから本質的になる、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。このような関連するTSLPRポリペプチドは、例えば、1つ以上のN結合型グリコシル化部位もしくはO結合型グリコシル化部位の付加および/または欠失、あるいは1つ以上のシステイン残基の付加および/または欠失を含み得る。

30

【0053】

関連する核酸分子はまた、配列番号2、配列番号5、または配列番号8のいずれかのTSLPRポリペプチドの、少なくとも約25個連続したアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約200アミノ酸、または約200個より多いアミノ酸残基のポリペプチドをコードする、TSLPR核酸分子のフラグメントを含む。

40

【0054】

さらに、関連するTSLPR核酸分子としてはまた、本明細書中に定義されるような中程度にストリンジェントな条件または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号1、配列番号4、配列番号7、配列番号10、もしくは配列番号11のいずれかのTSLPR核酸分子の完全な相補配列とか、または配列番号2、配列番号5、もしくは配列番号8のいずれかに示されるようなアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする分子の完全な相補配列とか、または本明細書中に定義されるような核酸フラグメントの完全な相補配列とか、または本明細書中に定義されるようなポリペプチドをコードする核酸フラグメントの完

50

全な相補配列、とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む分子が挙げられる。ハイブリダイゼーションプローブは、関連する配列に関して、cDNAライブラリー、ゲノムライブラリー、または合成DNAライブラリーをスクリーニングするために、本明細書中に提供されるTSLPR配列を用いて調製され得る。既知の配列と有意な同一性を示すTSLPRポリペプチドのDNA配列および/またはアミノ酸配列の領域は、本明細書中に記載されるような配列アラインメントアルゴリズムを用いて容易に決定され、そしてこれらの領域は、スクリーニングのためのプローブを設計するために使用され得る。

【0055】

用語「高度にストリンジェントな条件」は、配列が高度に相補的であるDNA鎖のハイブリダイゼーションを可能にし、そして有意にミスマッチしているDNAのハイブリダイゼーションを除外するように設計された、条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドのような変性剤の濃度によって、決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関する「高度にストリンジェントな条件」の例は、65~68 での、0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウムであるか、または42 での、0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、および50% ホルムアミドである。Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Andersonら、Nucleic Acid Hybridization: A Practical approach、第4章 (IRL Press Limited) を参照のこと。

【0056】

よりストリンジェントな条件(例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミド、または他の変性剤)もまた、使用し得る - しかし、ハイブリダイゼーションの速度は、影響される。他の薬剤が、非特異的なハイブリダイゼーションおよび/またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少させる目的で、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液に含まれ得る。例は、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニル-ピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(NaDodSO₄(SDS))、フィコール、デンハルト溶液、超音波処理されたサケ精子DNA(または別の非相補的DNA)、および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた、使用され得る。これらの添加物の濃度および型は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は、通常、pH6.8~7.4で実施されるが; 代表的なイオン強度条件において、ハイブリダイゼーションの速度は、ほとんどpHとは無関係である。Andersonら、Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach、第4章 (IRL Press Limited) を参照のこと。

【0057】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基の組成、長さ、および塩基対不一致の程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変数を適応させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にするように、当業者によって調整され得る。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の式によって概算され得る:

$$T_m(\text{ }) = 81.5 + 16.6 (\log [Na^+]) + 0.41 (\%G + C) - 600 / N - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、[Na⁺]は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中のナトリウムイオンのモル濃度であり、%G+Cは、ハイブリッド中の(グアニン+シトシン)塩基のパーセンテージである。不完全に一致したハイブリッドに関して、融解温度は、各1%の不一致に対して約1 ずつ減少する。

【0058】

10

20

30

40

50

用語「中程度にストリンジェントな条件」は、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るDNA二重鎖よりもより大きい程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が、形成し得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、50～65での、0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムであるか、または37～50での、0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、および20%ホルムアミドである。例として、0.015Mナトリウムイオン中、50の「中程度にストリンジェントな条件」は、約21%の不一致を許容する。

【0059】

「高度にストリンジェントな条件」と「中程度にストリンジェントな条件」との間に完全な区別は存在しないことが、当業者によって理解される。例えば、0.015Mナトリウムイオン（ホルムアミドなし）において、完全に一致した長いDNAの融解温度は、約71である。65（同じイオン強度）で洗浄する場合、これは、約6%不一致を許容する。より関連性の遠い配列を捕獲するために、当業者は、単に温度を低下させ得るか、またはイオン強度を上昇させ得る。

10

【0060】

約20ntまでのオリゴヌクレオチドプローブについて、1M NaCl^{*}における融解温度の適切な概算値は、以下によって提供される：

$T_m = 1 \text{ つの A - T 塩基につき } 2 + 1 \text{ つの G - C 塩基対につき } 4$

* 6xクエン酸ナトリウム塩（SSC）におけるナトリウムイオン濃度は、1Mである。

Suggsら、Developmental Biology Using Purified Genes 683（BrownおよびFox（編）1981）を参照のこと。

20

【0061】

オリゴヌクレオチドに対する高いストリンジェンシーの洗浄条件は、通常、6xSSC、0.1%SDSにおいて、このオリゴヌクレオチドのT_mの0～5下の温度である。

【0062】

別の実施形態において、関連する核酸分子は、配列番号1；配列番号4；配列番号7；配列番号10；または配列番号11のいずれかに示されるようなヌクレオチド配列と少なくとも約70パーセント同一であるヌクレオチド配列を含むかもしくはこれからなるか、あるいは配列番号2；配列番号5または配列番号8のいずれかに示されるポリペプチドと少なくとも約70パーセント同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくはこれから本質的になる。好ましい実施形態において、このヌクレオチド配列は、配列番号1；配列番号4；配列番号7；配列番号10；または配列番号11のいずれかに示されるヌクレオチド配列と、約75パーセント、または約80パーセント、または約85パーセント、または約90パーセント、または約95パーセント、96パーセント、97パーセント、98パーセントまたは99パーセント同一であるか、あるいは、このヌクレオチド配列は、配列番号2；配列番号5または配列番号8のいずれかに示されるポリペプチド配列と、約75パーセント、または約80パーセント、または約85パーセント、または約90パーセント、または約95パーセント、96パーセント、97パーセント、98パーセントまたは99パーセント同一であるポリペプチドをコードする。関連する核酸分子は、配列番号2；配列番号5；または配列番号8のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を有するポリペプチドをコードする。

30

40

【0063】

核酸配列における差異は、配列番号2；配列番号5；または配列番号8のいずれかのアミノ酸配列に対するアミノ酸配列の保存的改変および/または非保存的改変を生じ得る。

【0064】

配列番号2；配列番号5；または配列番号8のいずれかのアミノ酸配列に対する保存的改変（およびそれをコードするヌクレオチドに対する対応する改変）は、TSLPRポリペプチドに類似した機能的特徴および化学的特徴を有するポリペプチドを生成する。対照的に、TSLPRポリペプチドの機能的特徴および/または化学的特徴における実質的な改変は、配列番号2；配列番号5；または配列番号8のいずれかのアミノ酸配列における置

50

換を選択することによって達成され得、これらの置換は、(a)置換領域における分子骨格の構造(例えば、シートコンフォメーションまたはらせんコンフォメーション)、(b)標的部位における分子の電荷または疎水性、あるいは(c)側鎖の大きさを、維持することに対するその影響において有意に異なる。

【0065】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、その位置におけるアミノ酸残基の極性または電荷にほとんど影響がないかまたは全く影響がないような、ネイティブなアミノ酸残基の非ネイティブな残基による置換を含み得る。さらに、ポリペプチド中の任意のネイティブな残基はまた、「アラニンスキャニング変異誘発」に関して以前に記載されたように、アラニンで置換され得る。

10

【0066】

保存的アミノ酸置換はまた、天然に存在しないアミノ酸残基を含み、これらの残基は、生物系における合成によるよりむしろ化学的ペプチド合成によって代表的に組み込まれる。これらは、ペプチド模倣物、およびアミノ酸部分の他の逆転形態または反転形態を含む。

【0067】

天然に存在する残基は、共通の側鎖の特性に基づいてクラスに分けられ得る：

- 1) 疎水性：N o r l o i s i n、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e；
- 2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r；
- 3) 酸性：A s p、G l u；
- 4) 塩基性：A s n、G l n、H i s、L y s、A r g；
- 5) 鎖の方向に影響を与える残基：G l y、P r o；および
- 6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

20

【0068】

例えば、非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを、別のクラス由来のメンバーへと交換することを含み得る。このように置換された残基は、非ヒトT S L P Rポリペプチドと相同であるヒトT S L P Rポリペプチドの領域、またはこの分子の非相同性領域に、導入され得る。

【0069】

このような変更を作製する場合、アミノ酸のハイドロパシー指標が、考慮され得る。各アミノ酸は、その疎水性特徴および荷電特徴に基づいてハイドロパシー指標が割り当てられている。これらのハイドロパシー指標は、イソロイシン(+4.5)；バリン(+4.2)；ロイシン(+3.8)；フェニルアラニン(+2.8)；システイン/シスチン(+2.5)；メチオニン(+1.9)；アラニン(+1.8)；グリシン(-0.4)；スレオニン(-0.7)；セリン(-0.8)；トリプトファン(-0.9)；チロシン(-1.3)；プロリン(-1.6)；ヒスチジン(-3.2)；グルタミン酸(-3.5)；グルタミン(-3.5)；アスパラギン酸(-3.5)；アスパラギン(-3.5)；リジン(-3.9)およびアルギニン(-4.5)である。

30

【0070】

タンパク質に対して相互作用的な生物学的機能を付与することにおけるハイドロパシーアミノ酸指標の重要性は、当該分野において一般的に理解されている(K y t e ら、1982, J. Mol. Biol. 157: 105-31)。特定のアミノ酸が類似のハイドロパシー指標またはハイドロパシースコアを有する他のアミノ酸に代わって置換され得、そして依然として類似の生物学的活性を維持し得ることが、公知である。ハイドロパシー指標に基づいて変化を起こす際に、ハイドロパシー指標が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内であるものが特に好ましく、そして±0.5以内であるものが、なおより特に好ましい。

40

【0071】

類似のアミノ酸の置換が親水性に基づいて効果的になされ得る(特に、これによって作製された生物学的機能的に等価なタンパク質またはペプチドが、この場合においてと同様に、免疫学的実施形態における使用に関して考慮される場合)こともまた、当該分野におい

50

て理解されている。その隣接するアミノ酸の親水性によって支配される、タンパク質の最も大きな局所的平均親水性は、その免疫原性および抗原性に、すなわち、そのタンパク質の生物学的特性に、相関する。

【0072】

以下の親水性の値が、これらのアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン (+ 3.0)；リジン (+ 3.0)；アスパラギン酸 (+ 3.0 ± 1)；グルタミン酸 (+ 3.0 ± 1)；セリン (+ 0.3)；アスパラギン (+ 0.2)；グルタミン (+ 0.2)；グリシン (0)；スレオニン (- 0.4)；プロリン (- 0.5 ± 1)；アラニン (- 0.5)；ヒスチジン (- 0.5)；システイン (- 1.0)；メチオニン (- 1.3)；バリン (- 1.5)；ロイシン (- 1.8)；イソロイシン (- 1.8)；チロシン (- 2.3)；フェニルアラニン (- 2.5)；およびトリプトファン (- 3.4)。類似の親水性の値に基づいて変化を起こす際に、親水性値が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、± 1 以内であるものが特に好ましく、そして ± 0.5 以内であるものが、なおより特に好ましい。親水性に基づいて、一次アミノ酸配列から、エピトープを、同定もし得る。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」とも呼ばれる。

10

【0073】

所望のアミノ酸置換（保存的であれ非保存的であれ）は、当業者によって、そのような置換が所望される時点で決定され得る。例えば、アミノ酸置換を使用して、T S L P R ポリペプチドの重要な残基を同定し得るし、または本明細書中に記載される T S L P R ポリペプチドの親和性を増加もしくは減少させ得る。例示的なアミノ酸置換は、表 I に記載される。

20

【0074】

(表 I)

【0075】

【表 1】

元の残基	アミノ酸置換	
	例示的置換	好ましい置換
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, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ酪酸 , 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, ノルロイシン	Leu

10

20

30

当業者は、配列番号 2 ; 配列番号 5 ; または配列番号 8 のいずれかに記載のポリペプチドの適切な改変体を、周知の技術を使用して、決定し得る。生物学的活性を破壊することなく変更され得る分子の適切な領域を同定するために、当業者は、活性に重要であるとは考えられない領域を標的化し得る。例えば、同種由来かまたは他種由来の、類似の活性を有する類似のポリペプチドが既知である場合には、当業者は、T S L P R ポリペプチドのアミノ酸配列を、このような類似のポリペプチドと比較し得る。このような比較を用いて、類似のポリペプチド間で保存される分子の残基および部分を同定し得る。このような類似のポリペプチドに対して保存されていない、T S L P R 分子の領域における変化が、T S L P R ポリペプチドの生物学的活性および/または構造に不利な影響を与える可能性はほとんどないことが、理解される。当業者はまた、比較的保存された領域においてさえ、活性を維持しながら、天然に存在する残基を化学的に類似するアミノ酸で置換し得ることを認識している（保存的アミノ酸残基置換）。従って、生物学的活性または構造のために重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を破壊することなく、またはポリペプチド構造に

40

50

不利な影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換に供され得る。

【0076】

さらに、当業者は、活性または構造のために重要である、類似のポリペプチドにおける残基を同定する、構造-機能研究を再調査し得る。このような比較を考慮して、類似のポリペプチドにおける活性または構造のために重要なアミノ酸残基に対応するTSLPRポリペプチドにおける、アミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、TSLPRポリペプチドのこのような予測された重要なアミノ酸残基に代わる化学的に類似するアミノ酸での置換を、選択し得る。

【0077】

当業者はまた、類似のポリペプチドにおける三次元構造、およびその構造に関連するアミノ酸配列を分析し得る。このような情報を考慮して、当業者は、その三次元構造に関してTSLPRポリペプチドのアミノ酸残基のアライメントを予測し得る。当業者は、そのタンパク質の表面上に存在すると予測されるアミノ酸残基に対する急激な変化を起こさないように、選択し得る。なぜなら、このような残基は、他の分子との重要な相互作用に関与し得るからである。さらに、当業者は、各アミノ酸残基に単一のアミノ酸置換を含む、試験改変体を生成し得る。これらの改変体は、当業者に公知の活性アッセイを使用して、スクリーニングされ得る。このような改変体は、適切な改変体に関する情報を集めるために使用され得る。例えば、特定のアミノ酸残基に対する変化が、破壊された活性、望ましくなく減少した活性、または適切でない活性を生じたことを発見した場合には、このような変化を有する改変体は、回避される。換言すれば、このような慣用的な実験から集めた情報に基づいて、当業者は、さらなる置換が、単独でかまたは他の変異と組み合わせてかのいずれかで回避されるべきであるアミノ酸を、容易に決定し得る。

【0078】

多数の科学刊行物が、二次構造の推定に充てられてきた。Moult, 1996, Curr. Opin. Biotechnol. 7: 422-27; Chouら、1974, Biochemistry 13: 222-45; Chouら、1974, Biochemistry 113: 211-22; Chouら、1978, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 47: 45-48; Chouら、1978, Ann. Rev. Biochem. 47: 251-276; および Chouら、1979, Biophys. J. 26: 367-84を参照のこと。さらに、コンピュータプログラムが、二次構造の予測を補助するために現在利用可能である。二次構造を推測する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%よりも大きい配列同一性、または40%よりも大きい配列類似性を有する、2つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似した構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース(PDB)の近年の成長により、二次構造の推測可能性(ポリペプチド構造またはタンパク質構造内の潜在的な折り畳みの数を含む)の促進がもたらされた。Holmら、1999、Nucleic Acids Res. 27: 244-47を参照のこと。所定のポリペプチドもしくはタンパク質において限定された数の折り畳みが存在すること、および一旦臨界数の構造が決定されると、構造予測が劇的により正確になること、が示唆されている(Brennerら、1997、Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 369-76)。

【0079】

二次構造を推定するさらなる方法は、「スレッディング(threading)」(Jones, 1997, Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 377-87; Sipplら、1996, Structure 4: 15-19)、「プロフィール分析」(Bowleら、1991, Science, 253: 164-70; Gribskovら、1990, Methods Enzymol. 183: 146-59; Gribskovら、1987, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 84: 4355-58)、および「進化学的連鎖」(Holmら、前出、およびBrennerら、前出を参照のこと)を包含する。

【0080】

好ましいTSLPRポリペプチド改変体としては、グリコシル化部位の数および/または型が配列番号2；配列番号5；または配列番号8のいずれかに記載のアミノ酸配列と比較して変化している、グリコシル化改変体が挙げられる。1つの実施形態において、TSLPRポリペプチド改変体は、配列番号2；配列番号5；または配列番号8のいずれかに記載のアミノ酸配列より多いかまたはより少ない数のN結合グリコシル化部位を含む。N結合グリコシル化部位は、配列Asn-X-SerまたはAsn-X-Thrによって特徴付けられ、ここで、Xと印されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N結合型糖鎖の付加のための潜在的な新たな部位を提供する。あるいは、この配列を排除する置換は、存在するN結合型糖鎖を除去する。1つ以上のN結合グリコシル化部位（代表的には、天然に存在するグリコシル化部位）が排除され、そして1つ以上の新たなN結合部位が作製される、N結合型糖鎖の再配列もまた、提供される。さらなる好ましいTSLPR改変体としては、1つ以上のシステイン残基が、配列番号2；配列番号5；または配列番号8のいずれかに記載のアミノ酸配列と比較して欠失しているか、または別のアミノ酸（例えば、セリン）で置換されている、システイン改変体が挙げられる。システイン改変体は、TSLPRポリペプチドが、例えば不溶性の封入体の単離の後に、生物学的に活性な立体構造へとリフォールディングされなければならない場合に、有用である。システイン改変体は、一般に、ネイティブタンパク質より少ないシステイン残基を有し、そして代表的には偶数のシステイン残基を有し、対合していないシステインから生じる相互作用を最小にする。

10

20

【0081】

他の実施形態において、関連する核酸分子は、少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号2；配列番号5；または配列番号8のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかまたはこの配列からなり、そしてこのポリペプチドが配列番号2；配列番号5；または配列番号8のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有するか、あるいはこの関連する核酸分子は、少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号2；配列番号5；または配列番号8のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかまたはこの配列からなり、ここでこのポリペプチド配列番号2；配列番号5；または配列番号8のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する。関連する核酸分子はまた、配列番号2；配列番号5；または配列番号8のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかまたはこの配列からなり、このポリペプチドがカルボキシル末端および/またはアミノ末端の短縮を有し、そしてさらにこのポリペプチドが、配列番号2；配列番号5；または配列番号8のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する。関連する核酸分子はまた、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、カルボキシル末端短縮、およびアミノ末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を含む、配列番号2；配列番号5；または配列番号8のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかまたはこの配列からなり、そしてこのポリペプチドは配列番号2；配列番号5；または配列番号8のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する。

30

【0082】

さらに、配列番号2；配列番号5；または配列番号8のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドあるいは他のTSLPRポリペプチドは、同種ポリペプチドに融合されてホモダイマーを形成し得るか、あるいは異種ポリペプチドに融合されてヘテロダイマーを形成し得る。異種のペプチドおよびポリペプチドとしては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：TSLPR融合ポリペプチドの検出および/または単離を可能にするエピトープ；膜貫通レセプタータンパク質またはその部分（例えば、細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン）；膜貫通レセプタータンパク質に結合する、リガンドまたはその部分；触媒的に活性である、酵素またはその部分；オリゴマー化を促進するポリペプチドまたはペプチド（例えば、ロイシンジッパードメイン）；安定性を増加させるポリペプチドまたはペプチド（例えば、免疫グロブリン定常領域）；ならびに配列番号2

40

50

；配列番号5；または配列番号8のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドあるいは他のTSLPRポリペプチドとは異なる治療活性を有する、ポリペプチド。

【0083】

融合は、配列番号2；配列番号5；または配列番号8のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のTSLPRポリペプチドの、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、なされ得る。融合は、リンカーもアダプター分子も用いずに直接的であっても、リンカーもしくはアダプター分子を介してもよい。リンカーまたはアダプター分子は、1つ以上のアミノ酸残基であり得、代表的に、約20～約50アミノ酸残基であり得る。リンカーまたはアダプター分子はまた、融合した部分の分離を可能にするために、DNA制限エンドヌクレアーゼまたはプロテアーゼについての切断部位を有して設計され得る。一旦構築されると、融合ポリペプチドは、本明細書中に記載の方法に従って誘導体化され得ることが、理解される。

【0084】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号2；配列番号5；または配列番号8のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のTSLPRポリペプチドは、ヒトIgGのFc領域の1つ以上のドメインに融合される。抗体は、以下の2つの機能的に独立した部分を含む；抗原を結合する「Fab」として公知の可変ドメイン、ならびに補体活性化および食作用細胞による攻撃のようなエフェクター機能に関与する、「Fc」として公知の定常ドメイン。Fcは、長い血清半減期を有し、一方でFabは、短寿命である。Caponら、1989, *Nature* 337: 525-31。治療タンパク質と一緒に構築される場合には、Fcドメインは、より長い半減期を提供し得るか、またはFcレセプター結合、プロテインA結合、補体結合のような機能、および恐らく、胎盤移入のような機能さえも、組み込み得る(同書)。表IIは、当該分野において公知の特定のFc融合物の使用を要約する。

【0085】

(表II)

【0086】

【表2】

治療タンパク質とのFc融合物

Fcの形態	融合パートナー	治療的關係	参考文献
IgG1	CD30-LのN末端	ホジキン病; 未分化リンパ腫; T細胞白血病	米国特許第5, 480, 981号
マウス Fcγ2a	IL-10	抗炎症性; 移植拒絶	Zheng et al., 1995, <i>J. Immunol.</i> 154:5590-600
IgG1	TNFレセプター	敗血症性ショック	Fisher et al., 1996, <i>N. Engl. J. Med.</i> 334:1697-1702; Van Zee et al., 1996, <i>J. Immunol.</i> 156:2221-30
IgG, IgA, IgM, または IgE (第1ドメインを除く)	TNFレセプター	炎症、自己免疫障害	米国特許第5, 808, 029号
IgG1	CD4レセプター	AIDS	Capon et al., 1989, <i>Nature</i> 337: 525-31
IgG1, IgG3	IL-2のN末端	抗癌、抗ウイルス	Harvill et al., 1995, <i>Immunotech.</i> 1:95-105
IgG1	OPGのC末端	変形性関節症、骨密度	WO 97/23614
IgG1	レプチンのN末端	抗肥満症	1997年12月11日に出願された、PCT/US97/23183
ヒト Ig Cγ1	CTLA-4	自己免疫障害	Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-69

10

20

30

40

50

一例において、ヒトIgGのヒンジ領域、CH2領域、およびCH3領域が、当業者に公知の方法を使用して、TSLPRポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、融合され得る。別の例において、ヒトIgGのヒンジ領域、CH2領域、およびCH3領域は、TSLPRポリペプチドフラグメント（例えば、TSLPRポリペプチドの推定細胞外部分）のアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、融合され得る。

【0087】

得られるTSLPR融合ポリペプチドは、プロテインAアフィニティーカラムの使用によって、精製され得る。Fc領域に融合したペプチドおよびタンパク質は、融合していない対応物より実質的に長いインピボでの半減期を示すことが見出された。また、Fc領域への融合は、融合ポリペプチドの二量体化/多量体化を可能にする。このFc領域は、天然に存在するFc領域であってもよいし、または治療品質、循環時間、もしくは減少した凝集のような、特定の品質を改善するよう変更されてもよい。

10

【0088】

関連する核酸分子およびポリペプチドの同一性および類似性は、公知の方法によって容易に計算され得る。このような方法としては、Computational Molecular Biology (A. M. Lesk編、Oxford University Press 1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (D. W. Smith編、Academic Press 1993); Computer Analysis of Sequence Data (Part 1, A. M. GriffinおよびH. G. Griffin編、Humana Press 1994); G. von Heinle, Sequence Analysis in Molecular Biology (Academic Press 1987); Sequence Analysis Primer (M. GribskovおよびJ. Devereux編、M. Stockton Press 1991); ならびにCarilloら、1988, SIAM J. Applied Math., 48:1073に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0089】

同一性および/または類似性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間での最大の適合を生じるように、設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公に利用可能なコンピュータプログラムにおいて記載されている。2つの配列間の同一性および類似性を決定するための好ましいコンピュータプログラム方法としては、GCGプログラムパッケージ (GAP (Devereuxら、1984, Nucleic Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)、BLASTP、BLASTN、およびFASTA (Altschulら、1990, J. Mol. Biol. 215:403-10)を含む) が挙げられるが、これらに限定されない。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および他の供給源 (Altschulら、BLAST Manual (NCB NLM NIH, Bethesda, MD); Altschulら、1990、前出) から公に利用可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムもまた、同一性を決定するために使用され得る。

30

40

【0090】

2つのアミノ酸配列を整列させるための特定のライメントスキームは、これら2つの配列の短い領域のみの適合を生じ得、そしてこの小さな整列領域は、その2つの全長配列間に有意な関連がない場合でさえも、非常に高い配列同一性を有し得る。従って、好ましい実施形態において、選択されたライメント方法 (GAPプログラム) は、本願ポリペプチドのうち少なくとも50個連続するアミノ酸にわたる整列を生じる。

【0091】

例えば、コンピュータアルゴリズムGAP (Genetics Computer Gr

50

oup, University of Wisconsin, Madison, WI) を使用して、配列同一性の百分率が決定されるべき2つのポリペプチドが、それらのそれぞれのアミノ酸の最適な適合(このアルゴリズムによって決定される「適合した範囲」)のために、整列される。ギャップオープニングペナルティー(gap opening penalty)(これは、平均対角の3倍として計算される:「平均対角」とは、使用される比較行列(comparison matrix)の対角の平均である;「対角」とは、特定の比較行列によって各々の完全なアミノ酸適合に対して割り当てられたスコアまたは数である)およびギャップエクステンションペナルティー(gap extension penalty)(これは通常、ギャップオープニングペナルティーの0.1倍である)、ならびにPAM 250またはBLOSUM 62のような比較行列が、このアルゴリズムと組み合わせて使用される。標準的な比較行列もまた、このアルゴリズムによって使用される(Dayhoffら、5 Atlas of Protein Sequence and Structure(補遺3 1978)(PAM250比較行列); Henikoffら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19(BLOSUM 62比較行列)を参照のこと)。

10

20

30

40

50

【0092】

ポリペプチド配列比較のための好ましいパラメータとしては、以下が挙げられる:

アルゴリズム: NeedlemanおよびWunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-53;

比較行列: BLOSUM 62 (Henikoffら、前出);

ギャップペナルティー: 12

ギャップ長ペナルティー(Gap Length Penalty): 4

類似性の閾値(Threshold of Similarity): 0

このGAPプログラムは、上記パラメータを用いて有用である。上記パラメータは、GAPアルゴリズムを用いるポリペプチド比較のためのデフォルトパラメータ(末端ギャップに対してはペナルティーはない)である。

【0093】

核酸分子配列比較のための好ましいパラメータとしては、以下が挙げられる:

アルゴリズム: NeedlemanおよびWunsch, 前出;

比較行列: 適合 = +10, 非適合 = 0

ギャップペナルティー: 50

ギャップ長ペナルティー: 3

このGAPプログラムはまた、上記パラメータを用いて有用である。上記パラメータは、核酸分子比較のためのデフォルトパラメータである。

【0094】

Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997に記載されるものを含む、他の例示的なアルゴリズム、ギャップオープニングペナルティー、ギャップエクステンションペナルティー、比較行列、および類似性の閾値が使用され得る。なされるべき特定の選択は、当業者に明らかであり、そしてなされるべき特定の比較(例えば、DNA対DNA、タンパク質対タンパク質、タンパク質対DNA); ならびにさらに、その比較が所定の配列対の間(この場合には、GAPまたはBestFitが一般的に好ましい)であるか、1つの配列と大きな配列データベースとの間(この場合には、FASTAまたはBLASTAが好ましい)であるかに、依存する。

【0095】

(核酸分子)

TSLPRポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子は、種々の様式(化学合成、cDNAもしくはゲノムのライブラリーのスクリーニング、発現ライブラリースクリーニング、および/またはcDNAのPCR増幅が挙げられるが、これらに限定されない)で容易に得られ得る。

【0096】

本明細書中において使用される組換えDNA法は、一般に、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)および/またはCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994)に記載されている方法である。本発明は、本明細書中に記載されているような核酸分子、およびこのような分子を得るための方法を提供する。

【0097】

TSLPRポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子が1つの種から同定された場合には、この遺伝子の全てまたは一部を、オルソログ(ortholog)または同じ種由来の関連遺伝子を同定するためのプローブとして使用し得る。このプローブまたはプライマーを使用して、TSLPRポリペプチドを発現すると考えられる種々の組織供給源由来のcDNAライブラリーをスクリーニングし得る。さらに、配列番号1;配列番号4;配列番号7;配列番号10;または配列番号11のいずれかに記載されるような配列を有する核酸分子の部分または全てを使用して、ゲノムライブラリーをスクリーニングし、TSLPRポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を同定および単離し得る。代表的に、中程度または高度のストリンジェンシーの条件が、スクリーニングのために使用されて、このスクリーニングから得られる偽陽性の数を最少にする。

【0098】

TSLPRポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子はまた、発現されたタンパク質の特性に基づく陽性クローンの検出を使用する発現クローニングによって、同定され得る。代表的に、核酸ライブラリーは、抗体または他の結合パートナー(例えば、レセプターまたはリガンド)を、宿主細胞表面において発現および提示されたクローンタンパク質に結合させることによって、スクリーニングされる。抗体または結合パートナーは、所望のクローンを発現する細胞を同定するために、検出可能な標識で改変される。

【0099】

以下に記載される説明に従い実施される組換え発現技術に従って、これらのポリヌクレオチドを産生し得、そしてコードされたポリペプチドを発現させ得る。例えば、TSLPRポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することによって、当業者は、多量の所望されるヌクレオチド配列を容易に生成し得る。次いで、これらの配列を使用して、検出プローブまたは増幅プライマーを生成し得る。あるいは、TSLPRポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを、発現ベクターに挿入し得る。発現ベクターを適切な宿主に導入することによって、コードされたTSLPRポリペプチドが、多量に生成され得る。

【0100】

適切な核酸配列を得るための別の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である。この方法において、cDNAは、酵素リバーシトランスクリプターゼを使用して、ポリ(A)+RNAまたは全RNAから調製される。次いで、2つのプライマー(代表的には、TSLPRポリペプチドのアミノ酸配列をコードするcDNAの2つの別個の領域に対して相補的である)が、TaqポリメラーゼのようなポリメラーゼとともにこのcDNAに添加され、そしてこのポリメラーゼが、2つのプライマー間のcDNA領域を増幅する。

【0101】

TSLPRポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の手段は、Engelsら、1989, Angew. Chem. Intl. 第28版: 716-34によって記載されるような、当業者に周知の方法を使用する、化学合成である。これらの方法としては、とりわけ、核酸合成のためのホスホトリエステル、ホスホルアミダイト、およびH-ホスホネート方法が挙げられる。このような化学合成のために好ましい方法は、標準的なホスホルアミダイト化学を使用する、ポリマーにより支持される合成である。代

10

20

30

40

50

表的に、T S L P R ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、数百ヌクレオチド長である。約100ヌクレオチドより長い核酸は、これらの方法を使用して、いくつかのフラグメントとして合成され得る。次いで、これらのフラグメントと一緒に連結されて、T S L P R 遺伝子の全長ヌクレオチド配列を形成し得る。通常、このポリペプチドのアミノ末端をコードするDNAフラグメントは、A T G (これは、メチオニン残基をコードする)を有する。このメチオニンは、宿主細胞において産生されるポリペプチドがその細胞から分泌されるよう設計されているか否かに依存して、T S L P R ポリペプチドの成熟形態に存在してもそうでなくてもよい。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

【0102】

特定の実施形態において、核酸改変体は、所定の宿主細胞におけるT S L P R ポリペプチドの最適な発現のために変更されたコドンを含む。特定のコードン変更は、発現のために選択されるT S L P R ポリペプチドおよび宿主細胞に依存する。このような「コドン最適化」は、種々の方法によって(例えば、所定の宿主細胞において高度に発現される遺伝子において使用されるのに好ましいコドンを選択することによって)実施され得る。高度に発現された細菌遺伝子のコドン優先度(codon preference)についての「Eco_high.Cod」のようなコドン頻度表を組み込んだコンピュータアルゴリズムが使用され得、そしてUniversity of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI)によって提供される。他の有用なコドン頻度表としては、「Celegans_high.cod」、「Celegans_low.cod」、「Drosophila_high.cod」、「Human_high.cod」、「Maize_high.cod」、および「Yeast_high.cod」が挙げられる。

【0103】

いくつかの場合において、T S L P R ポリペプチド改変体をコードする核酸分子を調製することが所望され得る。改変体をコードする核酸分子は、プライマーが所望の点変異を有する部位特異的変異誘発、PCR増幅、または他の適切な方法を使用して生成され得る(変異誘発技術の説明に関しては、Sambrookら、前出、およびAusubelら、前出を参照のこと)。Engelsら、前出によって記載される方法を使用する化学合成もまた、このような改変体を調製するために使用され得る。当業者に公知の他の方法が、

【0104】

(ベクターおよび宿主細胞)

T S L P R ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を、標準的な連結技術を使用して適切な発現ベクターに挿入する。ベクターは、代表的に、使用される特定の宿主細胞において機能的であるように選択される(すなわち、ベクターは、遺伝子の増幅および/または遺伝子の発現が生じ得るように、宿主細胞機構と適合性である)。T S L P R ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、原核生物宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫(バキュロウイルス系)宿主細胞および/または真核生物宿主細胞において増幅/発現され得る。宿主細胞の選択は、T S L P R ポリペプチドが翻訳後修飾(例えば、グリコシル化および/またはホスホリル化)されるか否かに一部依存する。その場合、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、または哺乳動物宿主細胞が好ましい。発現ベクターの総説について、Meth.Enz., 第185巻(D.V.Goeddel編, Academic Press 1990)を参照のこと。

【0105】

代表的に、任意の宿主細胞に使用される発現ベクターは、プラスミド維持のための配列ならびに外来性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含む。このような配列(集合的に、「隣接配列」という)は、特定の実施形態において、代表的に、以下のヌクレオチド配列の1つ以上を含む: プロモーター、1つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナーおよびアクセプタープライス部位を含む完全なイントロ

10

20

30

40

50

ン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、ならびに選択可能マーカーエレメント。これらの配列のそれぞれが、以下に議論される。

【0106】

必要に応じて、ベクターは、「タグ」コード配列（すなわち、T S L P R ポリペプチドコード配列の5'末端または3'末端に配置されるオリゴヌクレオチド分子）を含み得；このオリゴヌクレオチド配列は、ポリHis（例えば、ヘキサHis）、または別の「タグ」（例えば、F L A G、H A（赤血球凝集素インフルエンザウイルス）またはmyc（これに対して、市販の抗体が存在する））をコードする。このタグは、代表的には、ポリペプチドの発現の際にポリペプチドに融合され、宿主細胞からの、T S L P R ポリペプチドのアフィニティー精製のための手段として役立ち得る。アフィニティー精製は、例えば、アフィニティーマトリクスとして、タグに対する抗体を使用するカラムクロマトグラフィーによって達成され得る。必要に応じて、タグは、引き続いて、切断のために特定のペプチダーゼを使用するような、種々の手段によって、精製されたT S L P R ポリペプチドから除去され得る。

10

【0107】

隣接配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種および/または株由来）であり得るか、異種（すなわち、宿主細胞種または株以外の種由来）であり得るか、ハイブリッド（すなわち、1つより多くの供給源由来の隣接配列の組み合わせ）であり得るか、または合成であり得るか、あるいは隣接配列は、T S L P R ポリペプチド発現を調節するために通常機能するネイティブな配列であり得る。このように、隣接配列の供給源は、隣接配列が、この宿主細胞の機構において機能的であり、そしてこの宿主細胞の機構によって活性化され得る限り、任意の原核生物または真核生物、任意の脊椎生物または無脊椎生物、または任意の植物であり得る。

20

【0108】

本発明のベクターに有用な隣接配列は、当該分野において周知である任意のいくつかの方法によって得られ得る。代表的には、T S L P R 遺伝子の隣接配列以外の、本発明で有用な隣接配列は、マッピングおよび/または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定されており、従って、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して、適切な組織供給源から単離され得る。いくつかの場合において、隣接配列の全長ヌクレオチド配列は公知であり得る。ここで、隣接配列は、核酸合成またはクローニングのために本明細書中で記載される方法を使用して合成され得る。

30

【0109】

隣接配列の全てまたは一部のみが既知である場合、これは、P C R を使用して、および/または適切なオリゴヌクレオチドおよび/または同種もしくは別の種由来の隣接配列フラグメントを用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られ得る。隣接配列が既知ではない場合、隣接配列を含むD N A のフラグメントは、例えば、コード配列または別の遺伝子さえも含み得る大きなD N A 片から単離され得る。単離は、適切なD N A フラグメントを生成するための制限エンドヌクレアーゼ消化、続くアガロースゲル精製、Q i a g e n（登録商標）カラムクロマトグラフィー（C h a t s w o r t h、C A）、または当業者に公知の他の方法を使用する単離によって達成され得る。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明らかである。

40

【0110】

複製起点は、代表的に、市販の原核生物発現ベクターの一部であり、この起点は、宿主細胞におけるベクターの増幅を補助する。特定のコピー数のベクターの増幅は、いくつかの場合において、T S L P R ポリペプチドの最適な発現のために重要であり得る。選択されたベクターが複製起点部位を含まない場合、複製起点は、既知の配列に基づいて化学的に合成され得、そしてベクターに連結され得る。例えば、プラスミドp B R 3 2 2（New England Biolabs, Beverly, MA）からの複製起点は、大部分

50

のグラム陰性細菌に適切であり、そして種々の起源（例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス（VSV）、またはHPVもしくはBPVのようなパピローマウイルス）は、哺乳動物細胞におけるベクターのクローニングのために有用である。一般的に、複製起点の成分は、哺乳動物発現ベクターには必要ない（例えば、SV40起源は、それが初期プロモーターを含むという理由のみによって、しばしば使用されている）。

【0111】

転写終結配列は、代表的にポリペプチドコード領域の3'末端に配置され、そして転写を終結させるのに役立つ。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、G-Cリッチフラグメントと、それに続くポリ-T配列である。この配列はライブラリーから容易にクロン化されるか、またはベクターの一部として市販すらされているが、これはまた、本明細書中に記載された核酸合成のための方法を使用して容易に合成され得る。

10

【0112】

選択マーカー遺伝子エレメントは、選択培養培地において増殖される宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。代表的な選択マーカー遺伝子は、(a)原核生物宿主細胞に対して、抗生物質または他の毒素（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、またはカナマイシン）に対する耐性を与えるか；(b)細胞の栄養要求性の欠損を補うか；あるいは、(c)複合培地から入手可能でない重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、およびテトラサイクリン耐性遺伝子である。ネオマイシン耐性遺伝子もまた、原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞における選択のために使用され得る。

20

【0113】

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用され得る。増幅は、増殖に重要なタンパク質の産生のために大いに要求されている遺伝子が、組換え細胞の継続世代の染色体内でタンデムに反復されるプロセスである。哺乳動物細胞に対する適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）およびチミジンキナーゼが挙げられる。哺乳動物細胞の形質転換体は、選択圧下に置かれ、ここで、形質転換体のみが、ベクターに存在する選択遺伝子によって生存するように独自に適応される。選択圧を、培地中の選択因子の濃度を連続的に変化させ、それによって選択遺伝子とTSLPRポリペプチドをコードするDNAとの両方の増幅を導く条件下で、形質転換された細胞を培養することによって課される。結果として、増加した量のTSLPRポリペプチドが、増幅されたDNAから合成される。

30

【0114】

リボソーム結合部位は、通常mRNAの翻訳開始に必要とされ、そしてShine-Dalgarno配列（原核生物）またはKozak配列（真核生物）により特徴付けられる。このエレメントは代表的に、プロモーターに対して3'に位置し、そして発現されるTSLPRポリペプチドのコード配列に対して5'に位置する。Shine-Dalgarno配列は、変化するが代表的にはポリプリンである（すなわち、高いA-G含量を有する）。多くのShine-Dalgarno配列が同定されており、これらのそれぞれは、本明細書中に示される方法および原核生物ベクターにおいて使用される方法を使用して、容易に合成され得る。

40

【0115】

リーダー配列またはシグナル配列は、TSLPRポリペプチドを宿主細胞から外に出すことを指向するために使用され得る。代表的に、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列は、TSLPR核酸分子のコード領域に配置されるか、またはTSLPRポリペプチドコード領域の5'末端に直接配置される。多くのシグナル配列が同定されており、そして選択された宿主細胞において機能的であるこれらのいずれかが、TSLPR核酸分子との結合において使用され得る。従って、シグナル配列は、TSLPR核酸分子に対して相同（天然に存在する）または異種であり得る。さらに、シグナル配列は、本明細書中に記載の方法を使用して化学的に合成され得る。ほとんどの場合、シグナルペプチドの存在を介

50

する宿主細胞からの T S L P R ポリペプチドの分泌は、分泌 T S L P R ポリペプチドからのシグナルペプチドの除去を生じる。シグナル配列は、ベクターの構成要素であってもよいし、またはこれはベクターに挿入される T S L P R 核酸分子の一部であってもよい。

【0116】

本発明の範囲内には、T S L P R ポリペプチドコード領域に連結されたネイティブな T S L P R ポリペプチドシグナル配列をコードするヌクレオチド配列、または T S L P R ポリヌクレオチドコード領域に連結された異種シグナル配列をコードするヌクレオチド配列のいずれかの使用が含まれる。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞により認識されそしてプロセッシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼにより切断される）シグナル配列であるべきである。ネイティブな T S L P R ポリペプチドシグナル配列を認識せず、プロセッシングしない原核生物宿主細胞について、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定エンテロトキシン I I のリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列により置換され得る。酵母分泌のために、ネイティブな T S L P R ポリペプチドシグナル配列は、酵母インベルターゼ、因子、または酸性ホスファターゼのリーダーにより置換され得る。哺乳動物細胞発現について、ネイティブなシグナル配列は十分であるが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。

10

【0117】

グリコシル化が真核生物宿主細胞発現系において所望されるようないくつかの場合、種々のプレ配列を操作してグリコシル化または収率を改良し得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更し得るかまたはプロ配列を付加し得、これはまた、グリコシル化に影響を与え得る。最終タンパク質産物は、（成熟タンパク質の最初のアミノ酸に対して）-1位に、発現に付随して1以上のさらなるアミノ酸を有し得、これは、完全に取り除かれていなくてもよい。例えば、最終タンパク質産物は、アミノ末端に結合されたペプチダーゼ切断部位において見出される1または2つのアミノ酸を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位の使用は、その酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域で切断する場合、所望の T S L P R ポリペプチドの、わずかに短縮された形態を生じ得る。

20

【0118】

多くの場合、核酸分子の転写は、ベクター中の1以上のイントロンの存在により増加する；これは、ポリペプチドが真核生物宿主細胞（特に、哺乳動物宿主細胞）において産生される場合に特にあてはまる。使用されるイントロンは、T S L P R 遺伝子（特に、使用される遺伝子が全長ゲノム配列またはそのフラグメントである場合）内に天然に存在し得る。イントロンが、遺伝子（ほとんどの c D N A に関して）内に天然に存在しない場合、このイントロンは、別の供給源から得られ得る。隣接配列および T S L P R 遺伝子に関するイントロンの位置は、イントロンは有効であるように転写されなければならないので、一般に重要である。従って、T S L P R c D N A 分子が転写されるべき場合、イントロンについての好ましい位置は、転写開始部位に対して3'であり、かつポリA転写終結配列に対して5'である。好ましくは、イントロンは、c D N A の一方の側または他方の側（すなわち、5'または3'）に位置し、その結果、イントロンは、そのコード配列を中断しない。イントロンが挿入される宿主細胞と適合するならば、任意の供給源（ウイルス、原核生物および真核生物（植物または動物）の生物体が挙げられる）由来の任意のイントロンを使用して、本発明を実施し得る。また、本明細書中には、合成イントロンが含まれる。必要に応じて、1より多くのイントロンをベクターにおいて使用し得る。

30

40

【0119】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には、宿主生物体により認識され、そして T S L P R ポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結されているプロモーターを含む。プロモーターは、構造遺伝子の転写を制御する、構造遺伝子（一般的には、約100~1000bp以内）の開始コドンに対して上流（すなわち、5'）に位置する、非翻訳配列である。プロモーターは従来、2つのクラス（誘導性プロモーターおよび構成性プロモーター）のうち一方に分類される。誘導性プロモーターは、培養条件

50

下でいくらかの変化（例えば、栄養素の存在もしくは非存在または温度の変化）にตอบสนองして、これらの制御下のDNAからの増加したレベルの転写を開始する。他方、構成性プロモーターは、連続的な遺伝子産物の産生を開始する；すなわち、遺伝子発現をほとんど制御しないかまたは制御しない。種々の潜在的な宿主細胞により認識される大量のプロモーターが周知である。適したプロモーターは、制限酵素消化により供給源DNAからプロモーターを取り除き、そしてベクターへ所望のプロモーター配列を挿入することにより、TSLPRポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結される。ネイティブなTSLPRプロモーター配列は、TSLPR核酸分子の増幅および/または発現を指向するために使用され得る。しかし、異種プロモーターがネイティブプロモーターと比較して、発現タンパク質のより多い転写およびより高収率を可能にする場合、および使用のために選択された宿主細胞系と適合する場合、異種プロモーターが好ましい。

10

【0120】

原核生物宿主を用いる使用に適切なプロモーターとしては、以下が挙げられる： -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系；アルカリホスファターゼ、トリプトファン（trp）プロモーター系；およびtacプロモーターのようなハイブリッドプロモーター。他の公知の細菌性プロモーターもまた適切である。これらの配列は、公開されており、それにより、当業者が、任意の有益な制限部位を供給する必要がある場合に、リンカーまたはアダプターを使用して所望のDNA配列にそれらを連結することを可能にする。

【0121】

酵母宿主を用いる使用に適切なプロモーターもまた、当該分野で周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターと共に有利に使用される。哺乳動物宿主細胞との使用に適切なプロモーターは、周知であり、そして以下：ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス2）、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、そして最も好ましくはシミアンウイルス40（SV40）のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーターが挙げられるが、これらに制限されない。他の適切な哺乳動物プロモーターとしては、異種哺乳動物プロモーター（例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーター）が挙げられる。

20

【0122】

TSLPR遺伝子発現を制御する際の目的のプロモーターであり得るさらなるプロモーターとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：SV40初期プロモーター領域（BernoisistおよびChambon, 1981, Nature 290:304-10）；CMVプロモーター；ラウス肉腫ウイルスの3'長末端反復に含まれるプロモーター（Yamamotoら, 1980, Cell 22:787-97）；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagnerら, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-45）、メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinsterら, 1982, Nature 296:39-42）、-ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター（Villa-Kamaroffら, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75:3727-31）；またはtacプロモーター（DeBoerら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:21-25）。以下の動物転写制御領域もまた目的のものであり、これらは、組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用されている：膵臓腺房細胞において活性であるエラストラーゼI遺伝子制御領域（Swiftら, 1984, Cell 38:639-46；Ornitzら, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409（1986）；MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515）；膵臓細胞中で活性であるインスリン遺伝子制御領域（Hanahan, 1985, Nature, 315:115-22）；リンパ系細胞中で活性である免疫グロブリン遺伝子制御領域（Grosschedlら, 1984, Cell 38:647-58；Adamesら, 1985, Nature 318:533-38；Alexand

30

40

50

erら, 1987, Mol. Cell. Biol., 7: 1436 - 44); 精巢細胞、乳房細胞、リンパ系細胞および肥満細胞において活性であるマウス乳腺癌ウイルス制御領域 (Ledererら, 1986, Cell 45: 485 - 95); 肝臓において活性であるアルブミン遺伝子制御領域 (Pinkertら, 1987, Genes and Devel., 1: 268 - 76); 肝臓において活性であるフェトプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlaufら, 1985, Mol. Cell. Biol., 5: 1639 - 1648; Hammerら, 1987, Science 235: 53 - 58); 肝臓において活性である 1-アンチトリプシン遺伝子制御領域 (Kelseyら, 1987, Genes and Devel. 1: 161 - 71); 骨髄性細胞において活性である - グロビン遺伝子制御領域 (Mogramら, 1985, Nature 315: 338 - 40; Kolliasら, 1986, Cell 46: 89 - 94); 脳中の稀突起膠細胞において活性であるミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (Readheadら, 1987, Cell 48: 703 - 12); 骨格筋において活性であるミオシン軽鎖 - 2 遺伝子制御領域 (Sani, 1985, Nature, 314: 283 - 86); および視床下部において活性である性腺刺激放出ホルモン遺伝子制御領域 (Masonら, 1986, Science 234: 1372 - 78)。

【0123】

エンハンサー配列は、高等真核生物による本発明の T S L P R ポリペプチドをコードする DNA の転写を増加させるためにベクターへ挿入され得る。エンハンサーは、DNA のシス作用性エレメントであり、通常約 10 ~ 300 bp 長であり、これは、プロモーターに対して作用して転写を増加させる。エンハンサーは比較的、配向依存性でありそして位置依存性である。エンハンサーは、転写単位に対して 5' 側および 3' 側に見出されている。哺乳動物遺伝子 (例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 - フェトプロテインおよびインスリン) から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が公知である。しかし、代表的に、ウイルス由来のエンハンサーが使用される。SV40 エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化についての例示的な増強エレメントである。エンハンサーは、T S L P R 核酸分子に対して 5' または 3' の位置でベクターへスプライスされ得るが、エンハンサーは、代表的には、プロモーターから 5' 部位に配置される。

【0124】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような出発ベクターから構築され得る。このようなベクターは、全ての所望の隣接配列を含んでも含まなくてもよい。本明細書中に記載の隣接配列のうち 1 以上が、ベクター中にまだ存在しない場合、これらは、それぞれ入手され、そしてベクターへ連結され得る。それぞれの隣接配列を得るために使用される方法は、当業者に周知である。

【0125】

本発明を実施するために好ましいベクターは、細菌宿主細胞、昆虫宿主細胞および哺乳動物宿主細胞と適合するベクターである。このようなベクターとしては、特に、pCRII、pCR3 および 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- (PCT 公開番号 WO90/14363) および pFastBacDual (Gibco - BRL, Grand Island, NY) が挙げられる。

【0126】

さらに適切なベクターとしては、コスミド、プラスミドまたは改変ウイルスが挙げられるがこれらに限定されない。しかし、このベクター系が選択された宿主細胞と適合しなければならないことが理解される。このようなベクターとしては、以下が挙げられるがこれら

に限定されない：例えば、Bluescript（登録商標）プラスミド誘導体（高コピー数ColE1ベースのファージミド；Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA）、Taq増幅されたPCR産物をクローニングするために設計されたPCRクローニングプラスミド（例えば、TOPOTM TA Cloning（登録商標）Kit, PCR2.1（登録商標）プラスミド誘導体、Invitrogen）のようなプラスミド、ならびに哺乳動物ベクター、酵母ベクターまたはウイルスベクター（例えば、バキュロウイルス発現系（pBacPAKプラスミド誘導体；Clontech））。

【0127】

ベクターが構築され、そしてTSLPRポリペプチドをコードする核酸分子がベクターの適切な部位に挿入された後、完成されたベクターは、増幅および/またはポリペプチド発現のために適切な宿主細胞へ挿入され得る。TSLPRポリペプチドについての発現ベクターの選択された宿主細胞への形質転換は、トランスフェクション、感染、塩化カルシウム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、DEAE-デキストラン法、または他の公知の技術のような方法を含む周知の方法によって達成され得る。選択される方法は、部分的に、使用される型の宿主細胞の機能である。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、例えば、Sambrookら、前出に記載される。

【0128】

宿主細胞は、原核生物宿主細胞（例えば、E. coli）または真核生物宿主細胞（例えば、酵母細胞、昆虫細胞、または脊椎動物細胞）であり得る。適切な条件下で培養される場合、宿主細胞は、TSLPRポリペプチドを合成し、これはその後培養培地から収集され得るか（宿主細胞がTSLPRポリペプチドを培地中に分泌する場合）、またはTSLPRポリペプチドを産生する宿主細胞から直接収集される（TSLPRポリペプチドが分泌されない場合）。適切な宿主細胞の選択は、種々の要因（例えば、所望の発現レベル、活性にとって所望であるかまたは必要であるポリペプチド改変（例えば、グリコシル化またはリン酸化）および生物学的に活性な分子への折り畳みの簡便性）に依存する。

【0129】

多数の適切な宿主細胞が当該分野で公知であり、そして多くのものがAmerican Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VAから入手可能である。例としては、哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、CHO DHFR(-)細胞（Urlaubら、1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 4216-20）、ヒト胎児腎臓（HEK）293細胞もしくは293T細胞または3T3細胞であり得る。適切な哺乳動物宿主細胞の選択ならびに形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物産生および精製のための方法は、当該分野で公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルCOS-1細胞株およびCOS-7細胞株ならびにCV-1細胞株である。さらなる例示的な哺乳動物宿主細胞としては、形質転換された細胞株を含む、霊長類細胞株およびげっ歯類細胞株が挙げられる。正常な二倍体細胞、一次組織のインビトロ培養に由来する細胞株、ならびに一次外植片もまた適切である。候補細胞は、遺伝子型的に選択遺伝子が欠損していてもよいし、または優性に作用する選択遺伝子を含んでいてもよい。他の適切な哺乳動物細胞株としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：マウス神経芽細胞腫N2A細胞、HeLa細胞、マウスL-929細胞、Swiss、Balb-cもしくはNIHマウスに由来する3T3株またはBHKハムスター細胞株もしくはHaKハムスター細胞株。これらの細胞株の各々は、タンパク質発現の分野の当業者に公知であり、そしてタンパク質発現の分野の当業者にとって利用可能である。

【0130】

本発明に適切な宿主細胞として同様に有用であるのは、細菌細胞である。例えば、E. coliの種々の株（例えば、HB101、DH5、DH10、およびMC1061）が、バイオテクノロジーの分野において宿主細胞として周知である。B. subtilis

、 *Pseudomonas* spp.、他の *Bacillus* spp.、*Streptomyces* spp. などの種々の株もまた、本方法において使用され得る。

【0131】

当業者に公知の酵母細胞の多くの株もまた、本発明のポリペプチドの発現のための宿主細胞として利用可能である。好ましい酵母細胞としては、例えば、*Saccharomyces cerevisiae* および *Pichia pastoris* が挙げられる。

【0132】

さらに、所望される場合、昆虫細胞系が、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Kittsら、1993、*Biotechniques*、14:810~17; Lucklow、1993、*Curr. Opin. Biotechnol.* 4: 564~72; および Lucklowら、1993、*J. Virol.*、67:4566~79に記載される。好ましい昆虫細胞は、Sf-9 および Hi5 (Invitrogen) である。

【0133】

グリコシル化 TSLPR ポリペプチドを発現するためにトランスジェニック動物もまた使用し得る。例えば、トランスジェニック乳汁産生動物（例えば、ウシまたはヤギ）を使用し得、そしてその動物の乳汁中の本発明のグリコシル化ポリペプチドを入手し得る。TSLPR ポリペプチドを産生するために植物もまた使用し得るが、一般に、植物中で生じるグリコシル化は、哺乳動物細胞にて産生されるものと異なり、そしてヒト治療用途に適切でないグリコシル化産生物を生じ得る。

【0134】

(ポリペプチド産生)

TSLPR ポリペプチド発現ベクターを含む宿主細胞が、当業者に周知の標準培地を使用して培養され得る。この培地は、通常、その細胞の増殖および生存に必要な栄養素すべてを含む。E. coli 細胞を培養するのに適切な培地は、例えば、Luria Broth (LB) および/または Terrific Broth (TB) が挙げられる。真核生物細胞を培養するのに適切な培地は、Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640)、Minimal Essential Medium (MEM)、および/または Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) であり、これらすべては、培養される特定の細胞株により必要とされる血清および/または増殖因子が補充され得る。昆虫培養に適切な培地は、必要な場合にはイーストレート (yeastolate)、ラクトアルブミン加水分解産物および/またはウシ胎仔血清を補充した、グレース培地である。

【0135】

代表的には、トランスフェクトまたは形質転換された細胞の選択的増殖に有用な抗生物質または他の化合物が、この培地に補充物として添加される。使用される化合物は、宿主細胞が形質転換されたプラスミド上に存在する選択マーカーエレメントにより決定される。例えば、その選択マーカーエレメントがカナマイシン耐性である場合、培養培地に添加される化合物は、カナマイシンである。選択的増殖のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリンおよびネオマイシンが挙げられる。

【0136】

宿主細胞により産生される TSLPR ポリペプチドの量は、当該分野で公知の標準的方法を使用して評価され得る。このような方法としては、限定はしないが、ウェスタンブロット分析、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) 分離、免疫沈降、および/または活性アッセイ (例えば、DNA 結合ゲルシフトアッセイ) が挙げられる。

【0137】

TSLPR ポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計された場合、ポリペプチドの大部分は、細胞培養培地にて見出され得る。しかし、TSLPR ポリペプチドが宿主細胞

胞から分泌されない場合、T S L P R ポリペプチドは細胞質および/または核（真核生物宿主細胞について）あるいは細胞質ゾル（グラム陰性細菌宿主細胞について）に存在する。

【0138】

宿主細胞細胞質および/または核（真核生物宿主細胞について）に位置するかまたは細胞質ゾル（細菌宿主細胞について）に位置するT S L P R ポリペプチドについて、細胞内物質（グラム陰性細菌について封入体を含む）が、当業者に公知の任意の標準的技術を使用して宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、フレンチプレス、ホモジナイゼーション、および/または超音波処理、それに続く遠心分離によって、ペリプラズム/細胞質の中身を放出するように溶解され得る。

10

【0139】

T S L P R ポリペプチドが細胞質ゾル内に封入体を形成した場合、この封入体は、しばしば、内部および/または外部細胞膜に結合され得、従って、主に、遠心分離後にペレット材料において見出される。次いで、ペレット材料は、pH極限值で処理され得るか、あるいはジチオトレイトールのような還元剤の存在下アルカリ性のpHで、またはトリスカルボキシエチルホスフィンの存在下酸性のpHで、界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、または尿素誘導体のようなカオトロピック剤で処理して、封入体を放出させ、分断させ、そして溶解させ得る。次いで、溶解されたT S L P R ポリペプチドは、ゲル電気泳動、免疫沈降などを使用して分析され得る。T S L P R ポリペプチドを単離することが望ましい場合、単離は、本明細書中およびMarstonら, 1990, Meth. Enz., 182: 264-75に記載される方法のような標準的な方法を使用して達成され得る。

20

【0140】

いくつかの場合、T S L P R ポリペプチドは、単離の際、生物学的に活性でなくても良い。「再折り畳みする」、つまり、ポリペプチドをその三次構造に変換し、ジスルフィド連結を生成するための種々の方法を使用して、生物学的活性を回復し得る。このような方法は、溶解されたポリペプチドをあるpH（通常7より上）および特定の濃度のカオトロピック剤（chaotropic）の存在に曝露する工程を包含する。カオトロピック剤の選択は、封入体溶解に使用される選択肢に非常に類似するが、通常、カオトロピック剤は低い濃度で使用され、溶解に使用されるカオトロピック剤と必ずしも同一ではない。多くの場合、再折り畳み/酸化溶液はまた、還元剤、または特定の比の還元剤およびその酸化形態を含んで、特定の酸化還元電位を生成し、タンパク質のシステイン架橋の形成を生じるジスルフィドシャフリングを可能にする。通常使用される酸化還元対のいくつかとしては、システイン/シスタミン、グルタチオン（GSH）/ジチオビスGSH、塩化銅（II）、ジチオトレイトール（DTT）/ジチアンDTT、および2,2-メルカプトエタノール（bME）/ジチオ-b（ME）が挙げられる。多くの場合において、共溶媒が使用され得るか、または再折り畳みの効率を増加するのに必要であり得、この目的のために使用されるより一般的な試薬としては、グリセロール、種々の分子量のポリエチレングリコール、アルギニンなどが挙げられる。

30

【0141】

封入体がT S L P R ポリペプチドの発現において有意な程度まで形成されない場合、ポリペプチドは、主に、細胞ホモジネートの遠心分離後に上清中に見出される。ポリペプチドは、さらに、本明細書中に記載されるような方法を使用して上清から単離され得る。

40

【0142】

溶液からのT S L P R ポリペプチドの精製は、種々の技術を使用して達成され得る。ポリペプチドが、ヘキサヒスチジン（T S L P R ポリペプチド/hexaHis）のようなタグまたは他の小さなペプチド（例えば、FLAG（Eastman Kodak Co., New Haven, CT）またはmyc（Invitrogen））をそのカルボキシ末端またはアミノ末端のいずれかにおいて含むように合成された場合、カラムマトリクスがタグについて高い親和性を有するアフィニティーカラムに溶液を通すことによって一

50

工程で精製され得る。

【0143】

例えば、ポリヒスチジンは、ニッケルに対して大きな親和性および特異性を有して結合する。従って、ニッケルのアフィニティークラム（例えば、Qiagen（登録商標）ニッケルカラム）は、TSLPRポリペプチド/polyHisの精製のために使用され得る。例えば、Current Protocols in Molecular Biology §10.11.8 (Ausubelら, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1993)を参照のこと。

【0144】

さらに、TSLPRポリペプチドは、TSLPRポリペプチドを特異的に認識し得、そして結合し得るモノクローナル抗体の使用によって精製され得る。 10

【0145】

精製のための他の適切な手段としては、限定しないが、アフィニティークロマトグラフィー、免疫親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、モレキュラーシーブクロマトグラフィー、HPLC、ゲル溶出が続く電気泳動（ネイティブゲル電気泳動を含む）、および分取用等電集束法（「Isoprime」machine/technique, Hoefer Scientific, San Francisco, CA）が挙げられる。いくつかの場合において、2つ以上の精製技術が、増加した純度を達成するために組み合わせられ得る。

【0146】

TSLPRポリペプチドはまた、Merrifieldら, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Houghtenら, 1985, Proc Natl Acad. Sci. USA 82:5132; およびStewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co. 1984)に記載されるような当該分野で公知の技術を使用する、化学合成法（例えば、固相ペプチド合成）によって調製され得る。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを有するかまたは有さないで合成され得る。化学的に合成されたTSLPRポリペプチドは、これら参考文献に記載される方法を使用して酸化され得、ジスルフィド架橋を形成し得る。化学的に合成されたTSLPRポリペプチドは、組換え的に産生されるかまたは天然の供給源から精製される対応するTSLPRポリペプチドに匹敵する生物学的活性を有すると期待され、従って、組換えまたは天然のTSLPRポリペプチドと相互交換可能に使用され得る。 30

【0147】

TSLPRポリペプチドを得る別の手段は、TSLPRポリペプチドが天然に見出される供給源の組織および/または流体のような生物学的サンプルからの精製による。このような精製は、本明細書中に記載されるようなタンパク質精製のための方法を使用して行われ得る。精製の間、TSLPRポリペプチドの存在が、例えば、組換え的に産生されたTSLPRポリペプチドまたはそのペプチドフラグメントに対して調製される抗体を使用してモニターされ得る。

【0148】

核酸およびポリペプチドを産生するための多くのさらなる方法は、当該分野において公知であり、この方法は、TSLPRポリペプチドに対して特異性を有するポリペプチドを産生するために使用され得る。例えば、Robertsonら, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12297-303を参照のこと。これは、mRNAとそのコードされるペプチドとの間の融合タンパク質の産生を記載する。Robertsonら, 1999, Curr. Opin. Chem. Biol. 3:268-73もまた参照のこと。さらに、米国特許第5,824,469号は、特定の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドを得るための方法を記載する。この手順は、異種プールのオリゴヌクレオチドを生成する工程を包含し、それぞれが、5'無作為化配列、中心予備選択配列、および3'ランダム化配列を有する。得られる異種プールは、所望の生物学的活性を 40 50

示さない細胞の集団に導入される。次いで、細胞の亜集団を、所定の生物学的機能を示すものについてスクリーニングする。その亜集団から、所望の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドが単離される。

【0149】

米国特許第5,763,192号；同第5,814,476号；同第5,723,323号；および同第5,817,483号は、ペプチドまたはポリペプチドを産生するためのプロセスを記載する。これは、確率論的遺伝子またはそのフラグメントを産生し、次いで、確率論的遺伝子によってコードされた1以上のタンパク質を産生する宿主細胞にこれらの遺伝子を導入することによって達成される。次いで、この宿主細胞は、所望の活性を有するペプチドまたはポリペプチドを産生する、これらのクローンを同定するためにスクリーニングされる。

10

【0150】

ペプチドまたはポリペプチドを産生するための別の方法は、Athersys, Inc. によって出願されたPCT/US98/20094 (WO99/15650)に記載されている。「Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery」(RAGE-GD)として知られているこのプロセスは、インサイチュ組換え方法によって、内因性遺伝子の発現または遺伝子の過剰発現の活性化を含む。例えば、内因性遺伝子の発現は、非相同性組換えまたは異常な組換えによって、遺伝子の発現を活性化し得る標的細胞中に、調節配列を組み込むことによって、活性化または増加される。この標的DNAは、まず、放射線に供せられ、そして遺伝子プロモーターに挿入される。このプロモーターは、遺伝子の前方に最終的に配置され、遺伝子の転写を開始する。これは、所望のペプチドまたはポリペプチドの発現を生じる。

20

【0151】

これらの方法は、包括的なTSLPRポリペプチド発現ライブラリーを作製するために使用され得、これは、続いて、種々のアッセイ(例えば、生化学的アッセイ、細胞アッセイおよび全生物アッセイ(例えば、植物、マウスなど))において、ハイスループット表現型スクリーニングのために使用され得ることが理解される。

【0152】

(合成)

本明細書中に記載される核酸およびポリペプチド分子は、組換えおよび他の手段によって産生され得ることは、当業者によって理解される。

30

【0153】

(選択的結合因子)

用語「選択的結合因子」は、1以上のTSLPRポリペプチドに対して特異性を有する分子を言う。適切な選択的結合因子としては、抗体およびその誘導体、ポリペプチド、ならびに小分子が挙げられるが、これらに限定されない。適切な選択的結合因子は、当該分野で公知の方法を使用して調製され得る。本発明の例示的なTSLPRポリペプチド選択的結合因子は、TSLPRポリペプチドの特定の部分を結合し得、これにより、ポリペプチドのTSLPRポリペプチドレセプターへの結合を阻害する。

40

【0154】

TSLPRポリペプチドと結合する抗体および抗体フラグメントのような選択的結合因子は、本発明の範囲内である。この抗体は、単一特異的なポリクローナルを含むポリクローナル；モノクローナル(MAb)；組換え；キメラ；ヒト化(例えば、相補性決定領域(CDR)移植化)；ヒト；単鎖；および/または二特異的；ならびにフラグメント；改変体；またはそれらの誘導体であり得る。抗体フラグメントとしては、TSLPRポリペプチド上のエピトープに結合する抗体のこれらの一部を含む。このようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素学的切断によって産生されたFabおよびF(ab')フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えDNA技術(例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む、組換えプラスミドの発現)によって産生されたフ

50

ラゲメントが挙げられる。

【0155】

TSLPRポリペプチドに指向したポリクローナル抗体は、一般に、TSLPRポリペプチドおよびアジュバンドの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって動物（例えば、ウサギまたはマウス）において産生される。TSLPRポリペプチドをキャリアタンパク質に結合させることは、有用であり得、このタンパク質は、キーホールリンペットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリブシンインヒビターのように、免疫化される種において免疫原性である。また、ミョウバンのような凝集剤は、免疫応答を増強させるために使用される。免疫化後、この動物は採血され、そして血清を、抗TSLPRポリペプチド抗体タイターについてアッセイする。

10

【0156】

TSLPRポリペプチドに指向したモノクローナル抗体は、培地中の連続的細胞株によって抗体分子を産生するために提供される、任意の方法を使用して産生される。モノクローナル抗体を調製するために適切な方法の例は、Kohlerら、1975、Nature 256:495-97のハイブリドーマ法、およびヒトB細胞ハイブリドーマ法（Kozbor, 1984, J. Immunol. 133:3001; Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987)）が挙げられる。TSLPRポリペプチドと反応する、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株がまた、本発明によって提供される。

20

【0157】

本発明のモノクローナル抗体は、治療剤として使用するために、改変され得る。1実施形態は、「キメラ」抗体であり、この重鎖（H）および/または軽鎖（L）の一部が、特定の種から誘導されるか、または特定の抗体のクラスもしくはサブクラスの属する抗体中の対応する配列と同一であるか、または相同性である一方で、この鎖の残りは、別の種から誘導されるか、または別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか、または相同性である。このような抗体のフラグメントが所望の生物学的活性を示す限り、これらの抗体のフラグメントも含まれる。米国特許第4,816,567号; Morrisonら, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-55を参照のこと。

30

【0158】

別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。米国特許第5,585,089号および5,693,762号を参照のこと。一般に、ヒト化した抗体は、非ヒトである供給源から導入された1以上のアミノ酸残基を有する。ヒト化は、例えば、当該分野（Jonesら, 1986, Nature 321:522-25; Riechmannら, 1998, Nature 332:323-27; Verhoevenら, 1988, Science 239:1534-36）で記載される方法を使用して、げっ歯類相補性決定領域の少なくとも一部をヒトの抗体の対応する領域と置換することによって、実施され得る。

40

【0159】

TSLPRポリペプチドと結合するヒト抗体がまた、本発明によって包含される。内因性の免疫グロブリンの産物の非存在下で、ヒト抗体のレパートリーを産生し得る、トランスジェニック動物（例えば、マウス）を使用して、このような抗体は、TSLPRポリペプチド抗原（すなわち、少なくとも6個の連続アミノ酸を有する）を用いて免疫化することによって産生され、必要に応じて、キャリアに結合される。例えば、Jakobovitsら, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:2551-55; Jakobovitsら, 1993, Nature 362:255-58; Bruggermannら, 1993, Year in Immunol. 7:33を参照のこと。1つの方法において、このようなトランスジェニック動物は、本明細書中の重鎖および軽鎖免疫

50

グロブリンをコードする内因性遺伝子座を無能にし、そしてヒトの重鎖および軽鎖タンパク質をコードする挿入遺伝子座をそのゲノムに挿入することによって産生される。次いで、部分的に改変された動物（この動物は、改変体の完全相補体未満を有する動物である）は、所望の免疫系の改変体の全てを有する動物を得るために交配される。免疫原が投与される場合、これらのトランスジェニック動物が、ヒト（例えば、マウスではない）アミノ酸配列（このアミノ酸配列は、これらの抗原に対して免疫特異性である可変領域を含む）を有する抗体を産生する。例えば、PCT出願番号PCT/US96/05928およびPCT/US93/06926を参照のこと。さらなる方法は、米国特許第5,545,807、PCT出願番号PCT/US91/245およびPCT/GB89/01207、ならびに欧州特許第546073B1および546073A1に記載される。ヒト抗体はまた、宿主細胞中の組換えDNAの発現または本明細書中に記載されるようなハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【0160】

代替の実施形態において、ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリから産生され得る（Hoogenboomら, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marksら, 1991, J. Mol. Biol. 222:581）。これらのプロセスは、糸状のバクテリオファージの表面上の抗体レパートリーのディスプレイを介する免疫選択、および選択した抗原への結合によるファージの引き続く選択を模倣する。1つのこのような技術は、PCT出願番号PCT/US98/17364に記載されており、これには、このようなアプローチを使用して、MPL-およびmsk-レセプターについて、高い親和性および機能的なアンタゴニスト抗体の単離が記載される。

【0161】

キメラ抗体、CDR移植化抗体、およびヒト化抗体は、代表的に組換え方法によって産生される。抗体をコードする核酸は、宿主細胞中に導入され、そして本明細書中に記載される物質および手順を使用して発現される。好ましい実施形態において、この抗体は、哺乳動物宿主細胞（例えば、CHO細胞）中で産生される。モノクローナル（例えば、ヒト）抗体は、本明細書中に記載されるように、宿主細胞中での組換えDNAの発現またはハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【0162】

本発明の抗-TSLPR抗体は、TSLPRポリペプチドの検出および定量的のために、任意の公知のアッセイ方法（例えば、競合結合アッセイ、直接および間接的サンドイッチアッセイ、および免疫沈降アッセイ）において使用され得る（Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)）。この抗体は、使用されるアッセイ方法に適切である親和性でTSLPRポリペプチドと結合する。

【0163】

診断適用のために、特定の実施形態において、抗TSLPR抗体は、検出可能な部分で標識され得る。この検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで、検出可能なシグナルを産生し得る任意の部分であり得る。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、¹²⁵I、⁹⁹Tc、¹¹¹In、または⁶⁷Ga）；蛍光化合物または化学的蛍光化合物（フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリン）、または酵素（アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、もしくは西洋ワサビペルオキシダーゼ）であり得る（Bayerら, 1990, Meth. Enz. 184:138-63）。

【0164】

競合結合アッセイは、標識した標準（例えば、TSLPRポリペプチド、またはその免疫学的に反応的な部分）の能力に依存し、限定された量の抗TSLPR抗体との結合に関して、試験サンプル検体（TSLPRペプチド）と競合する。試験サンプル中のTSLPRポリペプチドの量は、抗体と結合する標準の量と反比例する。結合する標準の量を決定するのを容易にするために、この抗体は、競合前または後に、代表的に不溶化され、この抗

体と結合する標準および検体は、結合しないままの標準および検体から好都合に分離され得る。

【0165】

サンドイッチアッセイは、2つの抗体の使用に代表的に関連し、各々は、検出および/または定量されるべきタンパク質の異なる免疫原性部分またはエピトープに結合し得る。サンドイッチアッセイにおいて、この試験サンプル検体は、固体支持体上に固定される第1抗体によって代表的に結合され、その後、第2抗体が、この検体に結合され、不溶性の3部の複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110号を参照のこと。第2抗体自体は、検出可能な部分で標識されるか(直接的なサンドイッチアッセイ)、または検出可能な部分で標識される抗免疫グロブリン抗体を使用して測定され得る(間接的なサンドイッチアッセイ)。例えば、サンドイッチアッセイの1つの型は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)(この場合、検出可能な部分は、酵素である)である。

10

【0166】

抗TSLPR抗体を含む、選択的結合因子はまた、インビボイメージングのために有用である。検出可能な部分で標識した抗体は、動物に、好ましくは、血流に投与され得、宿主中で標識した抗体の存在および位置がアッセイされる。この抗体は、核磁気共鳴、放射線学、または当該分野で公知の他の検出手段のいずれかによって、動物中で検出可能である任意の部分で標識され得る。

【0167】

抗体を含む、本発明の選択的結合因子は、治療剤として使用され得る。これらの治療剤は、一般に、アゴニストまたはアンタゴニストであり、これらは、少なくとも1つのTSLPRポリペプチドの生物学的活性を、それぞれ増強または減少させるかのいずれかである。1実施形態中で、本発明のアンタゴニスト抗体は、TSLPRポリペプチドに特異的に結合し得、そしてインビボまたはインビトロでTSLPRポリペプチドの機能活性を阻害または排除し得る抗体またはその結合フラグメントである。好ましい実施形態において、選択的結合因子(例えば、アンタゴニスト抗体)は、少なくとも約50%、および好ましくは、少なくとも約80%によって、TSLPRポリペプチドの機能活性を阻害する。別の実施形態において、選択的結合因子は、TSLPRポリペプチド結合パートナー(リガンドまたはレセプター)と相互作用し得る抗TSLPRポリペプチド抗体であり、これにより、インビトロまたはインビボにおいてTSLPRポリペプチド活性を阻害または排除する。アゴニストおよびアンタゴニスト抗TSLPRポリペプチド抗体を含む、選択的結合因子は、当該分野で周知であるスクリーニングアッセイによって同定される。

20

30

【0168】

本発明はまた、TSLPR選択的結合因子(例えば、抗体)を含むキットおよび生物学的サンプル中でTSLPRポリペプチドレベルを検出するために有用である他の試薬に関する。このような試薬はまた、血清を遮断する検出可能な標識、ポジティブおよびネガティブコントロールサンプル、および検出試薬を含み得る。

【0169】

(マイクロアレイ)

DNAマイクロアレイ技術は、本発明に従って利用され得ることが理解される。DNAマイクロアレイは、固体支持体(例えば、ガラス)上に配置された核酸の小型高密度アレイである。このアレイ内の各細胞またはエレメントは、相補的核酸配列(例えば、mRNA)とハイブリダイゼーションするための標的として作用する、単一の核酸種の複数のコピーを含む。DNAマイクロアレイ技術を使用する発現プロファイルにおいて、mRNAは、最初に細胞または組織から抽出され、次いで、蛍光標識されたcDNAに酵素学的に変換される。この材料は、マイクロアレイにハイブリダイズされ、そして未結合のcDNAは、洗浄により除去される。次いで、このアレイ上に示された個々の遺伝子の発現は、各々の標的核酸分子に特異的に結合される、標識されたcDNAの量を定量することによって可視化される。この方法において、数千の遺伝子の発現が、生物学的材料の単一サンプルから、ハイスループットの並行様式で定量され得る。

40

50

【0170】

このハイスループット発現プロフィールは、本発明のT S L P R分子に関連して広範の適用を有し、これには、以下が挙げられるが、これに限定されない：治療剤のための標的としてのT S L P R疾患関連遺伝子の同定および検証；関連するT S L P R分子およびそのインヒビターの分子毒性；臨床試験のための代替マーカーの集団および産生の階層化；およびハイスループットスクリーニングにおいて、選択化合物の同定を援助することによって、関連するT S L P Rポリペプチド小分子薬物発見を増強すること。

【0171】

(化学的誘導体)

T S L P Rポリペプチドの化学的に改変された誘導体は、この開示が、本明細書中に記載された場合、当業者によって調製され得る。T S L P Rポリペプチド誘導体は、このポリペプチドに天然で結合した分子の型または位置のいずれかで、異なる様式で改変される。誘導体は、1以上の天然で結合した化学基の欠失によって形成される分子を含み得る。配列番号2、配列番号5、もしくは配列番号8、または他のT S L P Rポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドは、1以上のポリマーの共有結合によって改変され得る。例えば、選択されたポリマーは、代表的に水溶性であり、その結果、結合するタンパク質は、水環境(例えば、生理学的な環境)下で沈殿しない。ポリマーの混合物が、適切なポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、目的産物の調製の治療学的使用のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。

【0172】

このポリマーの各々は、任意の分子量を有し得、そして分枝または非分枝であり得る。このポリマーの各々は、代表的に、約2 k D aと約100 k D aとの間の平均分子量を有する(この用語「約(およそ)」は、水溶性ポリマーの調製の際に、上記の分子量より多い、いくらか少ない重量を有することを示す)。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは、約5 k D aと約50 k D aとの間、より好ましくは、約12 k D aと約40 k D aとの間、そして最も好ましくは、約20 k D aと約35 D aとの間である。

【0173】

適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：N-連結炭水化物またはO-連結炭水化物、糖、リン酸、ポリエチレン、グリコール(P E G)(これは、モノ-(C₁-C₁₀)ポリエチレングリコール、アルコキシ-ポリエチレングリコール、またはアリアルコキシ-ポリエチレングリコールを含む、タンパク質を誘導体化するために使用されたP E Gの形態を含む)、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、デキストラン(例えば、低分子量(例えば、約6 k Dのデキストラン)、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ-(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、およびビニルアルコール。共有結合したT S L P Rポリペプチドマルチマーを調製するために使用され得る、二官能性架橋分子もまた、本発明に含まれる。

【0174】

一般に、化学的誘導体化は、活性化したポリマー分子とタンパク質を反応させるために使用される任意の適切な条件下で、実施され得る。ポリペプチドの化学的誘導体を調製するための方法は、一般に、以下の工程を包含する：(a)配列番号2、配列番号5、もしくは配列番号8、のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは他のT S L P Rポリペプチドが、1以上のポリマー分子に結合する条件下で、活性化したポリマー分子(例えば、ポリマー分子の反応性エステル誘導体またはアルデヒド誘導体)とこのポリペプチドを反応させる工程、ならびに(b)反応生成物を得る工程。最適の反応条件は、既知のパラメータおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、タンパク質に対するポリマー分子の比が大きくなるほど、結合したポリマー分子の割合も大きくなる。1実施形態において、T S L P Rポリペプチド誘導体は、アミノ末端に単一ポリマー分子部分を有する。例えば、米国特許第5,234,784号を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0175】

ポリペプチドのペグ化 (pegylation) は、当該分野で公知の任意のペグ化反応を使用して特異的に実施され得る。このような反応は、例えば、以下の参考文献に記載されている: Francisら, 1992, Focus on Growth Factors 3: 4-10; 欧州特許第0154316号および0401384号; ならびに米国特許第4,179,337号。例えば、ペグ化は、本明細書中に記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子 (または、類似の反応性水溶性ポリマー) とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施され得る。アシル化反応のために、選択されたポリマーは、単一の反応性エステル基を有する。還元的アルキル化について、選択されたポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有する。例えば、反応性アルデヒドは、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド (これは、水安定性である) であるか、またはそのモノC₁-C₁₀アルコキシ誘導体もしくはアリーロキシ誘導体である (米国特許第5,252,714号を参照のこと)。

10

【0176】

別の実施形態において、TSLPRポリペプチドは、ビオチンに化学的に連結され得る。次いで、このビオチン/TSLPRポリペプチド分子は、アビジンに結合され得、その結果、4価のアビジン/ビオチン/TSLPRポリペプチド分子が得られる。TSLPRポリペプチドはまた、ジニトロフェノール (DNP) またはトリニトロフェノール (TNP) に共有結合され得、そして得られた結合体は、抗-DNPまたは抗-TNP-IgMと共に沈殿し、10価の十量体の結合体を形成する。

20

【0177】

一般に、本発明のTSLPRポリペプチド誘導体の投与によって、緩和または調節され得る条件は、TSLPRポリペプチドについて本明細書中に記載されたものを含む。しかし、本明細書中に開示されるTSLPRポリペプチド誘導体は、非誘導体化分子と比較した場合、さらなる活性、増強または減少した生物学的活性、または他の特性 (例えば、増加または減少した半減期) を有し得る。

【0178】

(遺伝子操作した非ヒト動物)

マウス、ラット、または他のげっ歯類; ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物が、さらに本発明の範囲内に含まれ、ここで、天然のTSLPRポリペプチドをコードする遺伝子は破壊 (すなわち「ノックアウト」) され、TSLPRポリペプチドの発現レベルは、有意に減少するか、または完全に破壊される。このような動物は、米国特許第5,557,032号に記載されるような技術および方法を使用して調製され得る。

30

【0179】

本発明は、マウス、ラット、または他のげっ歯類; ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物をさらに含み、この動物のTSLPR遺伝子のネイティブの形態または非相同性TSLPR遺伝子のいずれかが、動物によって過剰発現され、これによって、「トランスジェニック」動物を作製する。このようなトランスジェニック動物は、米国特許第5,489,743号およびPCT公開番号WO94/28122号に記載されるような周知の方法を使用して調製され得る。

40

【0180】

本発明は、非ヒト動物をさらに含み、ここで、本発明の1以上のTSLPRポリペプチドのプロモーターは、(例えば、相同的な組換え方法を使用することによって) 活性化されるか、または不活化され、1以上のネイティブのTSLPRポリペプチドの発現のレベルを改変する。

【0181】

これらの非ヒト動物は、薬物候補物スクリーニングのために使用され得る。このようなスクリーニングにおいて、動物での薬物候補物の影響が測定され得る。例えば、薬物候補物は、TSLPR遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、産生

50

される T S L P R ポリペプチドの量は、この動物を薬物候補物に曝露した後に測定され得る。さらに、特定の実施形態において、動物での薬物候補物の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現により、疾患状態または病理学的状態を生じるか、または関連し得る。このような場合において、遺伝子の発現を減少させる薬物候補物の能力または病理学的状態を防止または阻害するための薬物候補物の能力を試験し得る。他の例において、ポリペプチドのフラグメントのような、特定の代謝産物の産生により、疾患状態または病理学的状態を生じ得るか、または関連し得る。このような場合において、このような代謝産物の産生を減少させるための薬物候補物の能力または病理学的状態を防止または阻害するための薬物候補物の能力を試験し得る。

【0182】

10

(T S L P R ポリペプチド活性の他の調節因子についてのアッセイ)

いくつかの状態において、 T S L P R ポリペプチドの活性の調節因子である分子 (すなわち、アゴニストまたはアンタゴニスト) を同定することが所望され得る。 T S L P R ポリペプチドを調節する天然または合成分子は、本明細書中に記載されるように、1以上のスクリーニングアッセイを使用して同定され得る。このような分子は、エキソビボ様式またはインビボ様式のいずれかで、注射、または経口送達、移植デバイスなどによって投与され得る。

【0183】

「試験分子」とは、 T S L P R ポリペプチドの活性を調節する (すなわち、増加または減少させる) ための能力について評価される分子を言う。最も一般的に、試験分子は、 T S L P R ポリペプチドと直接的に相互作用する。しかし、試験分子はまた、例えば、 T S L P R 遺伝子発現に影響を与えることによって、または T S L P R ポリペプチド結合パートナー (例えば、レセプターまたはリガンド) に結合することによって、 T S L P R ポリペプチド活性を直接的に調節し得る。1実施形態において、試験分子は、少なくとも約 10^{-6} M、好ましくは、約 10^{-8} M、より好ましくは、約 10^{-9} M、そしてさらにより好ましくは約 10^{-10} M の親和性定数 (*a f f i n i t y c o n s t a n t*) で T S L P R ポリペプチドと結合する。

20

【0184】

T S L P R ポリペプチドと相互作用する化合物を同定するための方法は、本発明によって包含される。特定の実施形態において、 T S L P R ポリペプチドは、試験分子と T S L P R ポリペプチドとの相互作用を可能にする条件下で、試験分子と共にインキュベートされ、そして相互作用の範囲が測定される。試験分子は、実質的に精製された形態または粗製の混合物でスクリーニングされ得る。

30

【0185】

特定の実施形態において、 T S L P R ポリペプチドアゴニストまたは T S L P R ポリペプチドアンタゴニストは、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量の分子であり得、これは、 T S L P R ポリペプチドと相互作用して、その活性を調節する。 T S L P R ポリペプチドの発現を調節する分子は、 T S L P R ポリペプチドをコードする核酸と相補的であるか、または T S L P R ポリペプチドの発現を指向または制御する核酸配列と相補的である核酸、および発現のアンチセンス調節因子として作用する核酸を含む。

40

【0186】

一旦、試験分子が、 T S L P R ポリペプチドと相互作用するとして同定されると、この分子は、 T S L P R ポリペプチド活性を増加または減少させる能力についてさらに評価され得る。試験分子と T S L P R ポリペプチドとの相互作用の測定は、以下を含むいくつかの様式で実施され得る：細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、液相アッセイ、および免疫アッセイ。一般に、試験分子は、特定の期間、 T S L P R ポリペプチドと共にインキュベートされ、そして T S L P R ポリペプチド活性は、生物学的活性を測定するために1以上のアッセイによって決定される。

【0187】

試験分子と T S L P R ポリペプチドとの相互作用はまた、免疫アッセイにおいて、ポリク

50

ローナル抗体またはモノクローナル抗体を使用して直接的にアッセイされ得る。あるいは、本明細書中に記載されるようなエピトープタグを含む T S L P R ポリペプチドの改変形態は、溶液および免疫アッセイ中で使用され得る。

【0188】

T S L P R ポリペプチドが、結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）との相互作用を介して、生物学的活性を示す場合において、種々のインビトロアッセイが、対応する結合パートナー（選択的結合因子、レセプター、またはリガンド）への T S L P R ポリペプチドの結合を測定するために使用され得る。これらのアッセイは、結合パートナーに対する T S L P R ポリペプチドの結合の速度および/または程度を増加または減少させるために、それらの能力について試験分子をスクリーニングするために使用され得る。1つのアッセイにおいて、T S L P R ポリペプチドは、マイクロタイタープレートのウェル中で固定化される。次いで、放射標識した T S L P R ポリペプチド結合パートナー（例えば、ヨウ素化した T S L P R ポリペプチド結合パートナー）および試験化合物は、このウェルに、一時に一方を（いずれかの順序で）または同時に添加され得る。インキュベーション後に、このウェルを洗浄し、そしてシンチレーション計数器を使用して、放射活性を計数し、結合パートナーが T S L P R ポリペプチドに結合する範囲を決定し得る。代表的に、分子は、濃度範囲にわたって試験され、そして試験アッセイの1以上要素を欠く一連のコントロールウェルは、結果の評価の正確性のために使用され得る。この方法の代わりは、このタンパク質の「位置」を逆にする工程（すなわち、マイクロタイタープレートウェルに対して T S L P R ポリペプチド結合パートナーを固定化し、試験分子および放射標識した T S L P R ポリペプチドをインキュベートし、そして T S L P R ポリペプチド結合の程度を決定する工程）を包含する。例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*、第18章（Ausubelら編、Green Publishers Inc. ならびに Wiley および Sons 1995）を参照のこと。

10

20

【0189】

放射性標識に対する代替として、T S L P R ポリペプチドまたはその結合パートナーは、ビオチンと結合体化され得、次いで、ビオチン化されたタンパク質の存在が、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）またはアルカリホスファターゼ（AP））（これらは、比色定量的に検出される）に結合したストレプトアビジンを使用して検出され得るか、またはストレプトアビジンの蛍光タグ化によって検出され得る。T S L P R ポリペプチドまたは T S L P R ポリペプチド結合パートナー（これらは、ビオチンに結合されている）に対する抗体はまた、AP または HRP に連結した酵素連結ストレプトアビジンとの複合体のインキュベーションに続いて、検出の目的のために使用され得る。

30

【0190】

T S L P R ポリペプチドまたは T S L P R ポリペプチド結合パートナーは、アガロースビーズ、アクリルビーズ、または他の型のこのような不活性な固体相基材への付着によって固定化され得る。基材-タンパク質複合体は、相補タンパク質および試験化合物を含む溶液内に配置され得る。インキュベーション後、これらのビーズは、遠心分離によって沈澱され得、そして T S L P R ポリペプチドとその結合パートナーとの間の結合の量が、本明細書中に記載の方法を使用して評価され得る。あるいは、基材-タンパク質複合体は、カラムを通過する、試験分子および相補タンパク質を用いてカラム内に固定化され得る。T S L P R ポリペプチドとその結合パートナーとの間の複合体の形成が、次いで、本明細書中に記載の技術（例えば、放射性標識または抗体結合）のいずれかを使用して評価され得る。

40

【0191】

T S L P R ポリペプチド結合タンパク質と T S L P R ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させる試験分子を同定するために有用な別のインビトロアッセイは、表面プラズモン共鳴検出器システム（例えば、BIAcore アッセイシステム（Pharmacia, Piscataway, NJ））である。この B I A c o r

50

e システムは、製造業者によって特定されるように利用される。このアッセイは、本質的に、T S L P R ポリペプチドまたはT S L P R ポリペプチド結合パートナーのいずれかの、デキストランでコートされたセンサーチップ（これは、検出器に存在する）への共有結合を含む。次いで、この試験化合物および他の相補タンパク質が、同時にかまたは連続的にかのいずれかで、センサーチップを含むチャンバーに注入され得る。結合する相補タンパク質の量は、センサーチップのデキストランコート側面に物理的に関係する分子の質量の変化に基づいて評価され得、この分子の質量の変化は、検出器システムによって測定される。

【0192】

いくつかの場合において、2つ以上の試験化合物と一緒に、T S L P R ポリペプチドとT S L P R ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させるそれらの能力について評価することが所望され得る。これらの場合において、本明細書中に記載のアッセイは、第一の試験化合物と同時に、またはそれに続いてのいずれかで、このようなさらなる試験化合物を添加することによって容易に改変され得る。このアッセイにおける工程の残りは、本明細書中に記載される。

10

【0193】

インビトロアッセイ（例えば、本明細書中に記載されるもの）は、T S L P R ポリペプチドとT S L P R ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成に対する効果について、多数の化合物をスクリーニングするために、有利に使用され得る。これらのアッセイは、ファージディスプレイ、合成ペプチド、および化学合成ライブラリーにおいて生成された化合物をスクリーニングするために、自動化され得る。

20

【0194】

T S L P R ポリペプチドとT S L P R ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少する化合物はまた、T S L P R ポリペプチドまたはT S L P R ポリペプチド結合パートナーのいずれかを発現する細胞および細胞株を使用して、細胞培養物においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞株は、任意の哺乳動物から得られ得るが、好ましくは、ヒト、または他の霊長類、イヌ類またはげっ歯類の供給源由来である。T S L P R ポリペプチドの、T S L P R ポリペプチド結合パートナーを発現する細胞への、その表面での結合は、試験分子の存在または非存在下で評価され、そして結合の程度が、例えば、T S L P R ポリペプチド結合パートナーに対するビオチン化抗体を使用するフローサイトメトリーによって決定され得る。細胞培養アッセイは、本明細書中に記載されるタンパク質結合アッセイにおいて、陽性であるとスコア付けされる化合物をさらに特徴付けるために有利に使用され得る。

30

【0195】

細胞培養物はまた、薬物候補の影響をスクリーニングするために使用され得る。例えば、薬物候補は、T S L P R 遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、生成されるT S L P R ポリペプチドまたはT S L P R ポリペプチドフラグメントの量は、細胞培養物の薬物候補への曝露の後に測定され得る。特定の実施形態において、細胞培養物への薬物候補の実質的な影響が検出され得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、細胞培養物への特定の影響を有し得る。このような場合に、遺伝子の発現を増加または減少させる薬物候補の能力、または細胞培養物に対する特定の影響を予防または阻害するその能力が試験され得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメントなど）の生成が、疾患または病的状態を生じ得るか、またはそれらと関連し得る。このような場合、細胞培養物におけるこのような代謝産物の生成を減少する薬物候補の能力が試験され得る。

40

【0196】

（内部移行タンパク質）

t a t タンパク質配列（H I V 由来）が、タンパク質を細胞内に内部移行させるために、使用され得る。例えば、F a l w e l l ら、1994、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 91:664-68を参照のこと。例えば、H I V t a t タンパ

50

ク質の11アミノ酸の配列(Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R;配列番号13)、「タンパク質形質導入ドメイン」、またはTAT-PDTと称される)は、細胞の細胞質膜および核膜を横切る送達を媒介するとして記載されている。Schwarzeら, 1999, Science 285:1569-72;およびNagaharaら, 1998, Nat. Med. 4:1449-52を参照のこと。これらの手順において、FITC構築物(FITC標識G-G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R;配列番号14)(これは、腹腔内投与に続いて組織を貫通する)が調製され、そしてこのような構築物の細胞への結合が、蛍光細胞分析分離(FACS)分析によって検出される。tat-gal融合タンパク質で処理された細胞は、gal活性を示す。注入に続いて、このような構築物の発現が、多くの組織(肝臓、腎臓、肺、心臓および脳組織を含む)において検出され得る。このような構築物は、細胞に入るためにある程度の変性を受け、そしてそれ自体、細胞内への移入後、再折り畳みを必要とし得ると考えられる。

【0197】

従って、tatタンパク質配列は、所望のポリペプチドを細胞に内部移入させるために使用されることが理解される。例えば、tatタンパク質配列を使用して、TSLPRアンタゴニスト(例えば、抗TSLPR選択的結合因子、低分子、可溶性レセプター、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド)は、TSLPR分子の活性を阻害するために、細胞内投与され得る。本明細書中で使用される場合、用語「TSLPR分子」は、本明細書中に規定されるような、TSLPR核酸分子およびTSLPRポリペプチドの両方をいう。所望の場合、TSLPRタンパク質自体はまた、これらの手順を使用して、細胞に内部投与され得る。Straus, 1999, Science 285:1466-67をまた参照のこと。

【0198】

(TSLPRポリペプチドを使用する細胞供給源の同定)

本発明の特定の実施形態に従って、TSLPRポリペプチドと関連する特定の細胞型の供給源を決定することを可能することが有用であり得る。例えば、適切な治療を選択する際の補助として疾患または病的状態の起源を決定することが有用であり得る。特定の実施形態において、TSLPRポリペプチドをコードする核酸は、プローブとして使用されて、このようなプローブを用いて細胞の核酸をスクリーニングすることによって、本明細書中に記載の細胞を同定し得る。他の実施形態において、抗TSLPRポリペプチド抗体を使用して、細胞におけるTSLPRポリペプチドの存在について試験し得、従って、このような細胞が本明細書中に記載される型の細胞か否かを決定し得る。

【0199】

(TSLPRポリペプチド組成物および投与)

治療組成物は、本発明の範囲内である。このようなTSLPRポリペプチド薬学的組成物は、治療有効量のTSLPRポリペプチドまたはTSLPR核酸分子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的にまたは生理学的に受容可能な処方薬剤との混合物中に、含み得る。薬学的組成物は、治療有効量の1以上のTSLPRポリペプチド選択的結合因子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的にまたは生理学的に受容可能な処方薬剤との混合物中に、含み得る。

【0200】

受容可能な処方物材料は、好ましくは、使用される投薬量および濃度で、レシピエントに対して非毒性である。

【0201】

薬学的組成物は、例えば、pH、浸透圧重量オスモル濃度、粘度、清澄性、色、等張性、におい、無菌性、安定性、溶解または放出の速度、吸着、または組成物の浸透を改変、維持または保存するための処方物材料を含み得る。適切な処方物材料としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アミノ酸(例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン)、抗菌剤、抗酸化剤(例えば、アスコルビン酸、亜硫

酸ナトリウム、または亜硫酸水素ナトリウム (sodium hydrogen - sulfite)、緩衝液 (例えば、ホウ酸塩、炭酸水素塩、Tris - HCl、クエン酸塩、リン酸塩、または他の有機酸)、バルキング剤 (例えば、マンニトールまたはグリシン)、キレート化剤 (エチレンジアミン四酢酸 (EDTA))、複合体化剤 (例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、 β -シクロデキストリン、またはヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン)、フィラー、単糖類、二糖類、および他の炭水化物 (例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン)、タンパク質 (例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン)、着色剤、味付け剤および希釈剤、乳化剤、親水性ポリマー (例えば、ポリビニルピロリドン)、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン (例えば、ナトリウム)、保存剤 (例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸、または過酸化水素)、溶媒 (例えば、グリセリン、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール)、糖アルコール (例えば、マンニトールまたはソルビトール)、懸濁剤、表面活性剤または湿潤剤 (例えば、プルオニック (pluronic) ; PEG ; ソルビタンエステル ; ポリソルビベート (例えば、poly sorbate 20 または poly sorbate 80) ; トリトン ; トロメタミン ; レシチン ; コレステロールまたはチロキサポール (tyloxapal))、安定性増強剤 (例えば、スクロースまたはソルビトール)、張度増強剤 (例えば、ハロゲン化アルカリ金属 (好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム)、またはマンニトール、ソルビトール)、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および / または薬学的なアジュバント。Remington's Pharmaceutical Sciences (第 18 版, A. R. Gennaro 編, Mack Publishing Company 1990 を参照のこと)。

【0202】

最適な薬学的組成物は、当業者によって、例えば、意図される投与経路、送達形式、および所望の投薬量に依存して決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出を参照のこと。このような組成物は、TSLPR 分子の、物理的な状態、安定性、インビボ放出の速度、およびインビボクリアランスの速度に影響し得る。

【0203】

薬学的組成物における主要なビヒクルまたはキャリアは、本来水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、注入のための適切なビヒクルまたはキャリアは、水、生理学的な生理食塩水溶液、または人工脳脊髄液であり、おそらく非経口投与のための組成物において他の一般的な材料で補充されている。中性の緩衝化生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。他の例示的な薬学的組成物は、約 pH 7.0 - 8.5 の Tris 緩衝液または約 pH 4.0 - 5.5 の酢酸塩緩衝液を含み、これはさらに、ソルビトールまたは適切な置換物を含み得る。本発明の 1 つの実施形態において、TSLPR ポリペプチド組成物は、所望の程度の純度を有する選択された組成物を、任意の処方薬剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出) と混合することによって、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で、保存のために調製され得る。さらに、TSLPR ポリペプチド産物は、スクロースのような適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として処方され得る。

【0204】

この TSLPR ポリペプチドの薬学的組成物は、非経口送達のために選択され得る。あるいは、これらの組成物は、吸入または消化管を介する送達 (例えば、経口的に) のために、選択され得る。このような薬学的に受容可能な組成物の調製は、当該分野の技術内にある。

【0205】

処方成分が、投与の部位に受容可能な濃度で存在する。例えば、緩衝液は、生理学的 pH または多少より低い pH (典型的に、約 5 ~ 約 8 の pH 範囲内) にこの組成物を維持する

ために使用される。

【0206】

非経口投与が意図される場合、本発明における使用のための治療組成物は、薬学的に受容可能なビヒクルに所望のTSLPR分子を含み、発熱物質を含まない非経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。非経口注入のために特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水であり、ここで、TSLPR分子が、滅菌で、等張溶液として処方され、適切に保存される。なお別の調製物は、所望の分子と、粒子（例えば、注入可能なマイクロスフィア、生体腐食（bio-erodible）薬剤、ポリマー化合物（ポリ乳酸またはポリグリコール酸）、ビーズまたはリポソーム）との処方物に関係し得、これは、産物の制御されたまたは持続された放出を提供し、この産物は、次いで蓄積注射を介して送達され得る。ヒアルロン酸がまた、使用され得、そしてこれは、循環において、維持された持続時間を促進する効果を有し得る。所望の分子の導入のための他の適切な手段は、移植可能な薬物送達デバイスを含む。

10

【0207】

1つの実施形態において、薬学的組成物は、吸入のために処方され得る。例えば、TSLPRポリペプチドは、吸入のための乾燥粉末として処方され得る。TSLPRポリペプチドまたは核酸分子の吸入溶液はまた、エアロゾル送達のための噴霧体と共に処方され得る。なお別の実施形態において、溶液は、噴霧され得る。肺投与が、PCT公開番号WO94/20069にさらに記載され、これは化学的に改変されたタンパク質の肺送達を記載する。

20

【0208】

特定の処方物が、経口投与され得ることがまた企図される。本発明の1つの実施形態において、このよう様式で投与されるTSLPRポリペプチドが、固体投薬形態（例えば、錠剤またはカプセル）の調合において慣用的に使用されるキャリアを伴うか、または伴わずに処方され得る。例えば、カプセルは、バイオアベイラビリティが最大化され、そして前全身分解が最小化される場合、胃腸管内での点で処方物の活性部分を放出するように設計され得る。さらなる薬剤が、TSLPRポリペプチドの吸収を容易にするために含まれ得る。希釈剤、味付け剤、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、およびバインダーがまた、使用され得る。

【0209】

別の薬学的組成物は、錠剤の製造に適切な非毒性賦形剤との混合物中に、有効量のTSLPRポリペプチドを含み得る。錠剤を滅菌水または別の適切なビヒクルに溶解することによって、溶液が、単位用量形態で調製され得る。適切な賦形剤は以下を含むが、これらに限定されない：不活性な希釈剤（炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムまたは炭酸水素ナトリウム、ラクトース、あるいはリン酸カルシウム）；または結合剤（例えば、デンプン、ゼラチンまたはアラビアゴム）；あるいは潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク）。

30

【0210】

さらなるTSLPRポリペプチドの薬学的組成物は、当業者に明らかであり、持続または制御送達処方物中にTSLPRポリペプチドを含む処方物を含む。種々の他の持続または制御送達手段（例えば、リポソームキャリア、生体腐微粒子あるいは多孔性ビーズおよび蓄積注射）を処方するための技術はまた、当業者に公知である。例えば、PCT/US93/00829（これは、薬学的組成物の送達のための多孔性ポリマー性微粒子の制御放出を記載する）を参照のこと。

40

【0211】

徐放性調製物のさらなる例としては、成形された物品の形態（例えば、フィルム、またはマイクロカプセル）の半透過性ポリマーマトリックスを含む。徐放性マトリックスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号および欧州特許第058481号）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートとのコポリマー（Sidmanら, 1983, Biopolymers 22:547-56）、

50

ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)(Langerら, 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277およびLanger, 1982, Chem. Tech. 12: 98-105)、エチレンビニルアセテート(Langerら, 前出)またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸(欧州特許第133988号)。徐放性組成物はまた、リポソームを含み得、これは、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製され得る。例えば、Eppsteinら, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688-92; および欧州特許第036676号、同第088046号、および同第143949号を参照のこと。

【0212】

インビボ投与のために使用されるTSLPRの薬学的組成物は、代表的に滅菌でなければならず。このことは、滅菌濾過膜を介する濾過によって達成され得る。組成物が、凍結乾燥される場合、この方法を使用する滅菌は、凍結乾燥および再構成の前に、またはそれに続いてのいずれかで実施され得る。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥された形態または溶液で保存され得る。さらに、非経口組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器(例えば、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアル)内に配置される。

【0213】

一旦、薬学的組成物が処方されると、それは、滅菌バイアル中に溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、または脱水和粉末もしくは凍結乾燥粉末として保存され得る。このような処方物は、すぐに使用できる形態または投与の前に再構成を必要とする形態(例えば、凍結乾燥された形態)のいずれかで保存され得る。

【0214】

特定の実施形態において、本発明は、単一用量投与単位を生成するためのキットに関する。このキットは、各々、乾燥タンパク質を有する第一の容器および水性処方物を有する第二の容器の両方を含み得る。また、本発明の範囲内には、単一および多チャンバーの予め充填されたシリンジ(例えば、液体シリンジおよび分散シリンジ(lyosyringe))を含むキットが含まれる。

【0215】

治療的に使用されるTSLPRの薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の内容および目的に依存する。当業者は、処置のための適切な投薬レベルが、従って、送達される分子、TSLPR分子が使用されている指標、投与の経路、および患者のサイズ(体重、体表面、または器官の大きさ)および状態(年齢および一般的な健康)に、部分的に依存して変化することを理解する。従って、臨床医は、最適な治療効果を得るために、投薬量を力価決定し(titer)、投与経路を改変し得る。代表的な投薬量は、上記の因子に依存して、約0.1 μg/kg ~ 約100 mg/kg以上までの範囲であり得る。他の実施形態において、投薬量は、0.1 μg/kg ~ 約100 mg/kgまで; または1 μg/kg ~ 約100 mg/kgまで; または5 μg/kg ~ 約100 mg/kgまでの範囲であり得る。

【0216】

投薬の頻度は、使用される処方物中でのTSLPR分子の薬物動態学のパラメーターに依存する。典型的に、臨床医は、所望の効果を達成する投薬量に達するまで組成物を投与する。従って、組成物は、経時的な単一用量として、2以上の用量(これは、同量の所望の分子を含んでも、含まなくてもよい)として、あるいは移植デバイスまたはカテーテルを介する連続的な注入として、投与され得る。適切な投薬量のさらなる改良は、当業者によって慣用的になされ、そしてそれらによって慣用的に実施される課題の範囲内である。適切な投薬量は、適切な用量-応答データの使用を介して確認され得る。

【0217】

薬学的組成物の投与の経路は、以下のような公知の方法と一致する: 例えば、経口的に; 静脈内、腹腔内、脳内(実質内の)、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、または病巣内の経路による注入を介して; 徐放性系によって; または移植デバイスによって。所望

される場合、これらの組成物は、ボーラス注射によって投与され得るか、または注入によって連続的に投与され得るか、または移植デバイスによって投与され得る。

【0218】

あるいはまたはさらに、この組成物は、その上に所望の分子が吸収されるかまたはカプセル化される膜、スポンジ、または他の適切な材料の移植を介して局所的に投与され得る。移植デバイスが使用される場合、このデバイスは、任意の適切な組織または器官に移植され得、そして所望の分子の送達は、拡散、時限放出ボーラスまたは連続的な投与を介し得る。

【0219】

いくつかの場合において、エキソピボ様式において、T S L P R ポリペプチドの薬学的組成物を使用することが所望され得る。このような例において、患者から取り出された細胞、組織、または器官は、これらの細胞、組織、または器官が引き続いて患者に移植して戻された後にT S L P R ポリペプチド薬学的組成物に曝露される。 10

【0220】

他の場合において、T S L P R ポリペプチドは、本明細書中に記載されるような方法を使用して、遺伝的に操作されて、T S L P R ポリペプチドを発現および分泌する特定の細胞を移植することによって送達され得る。このような細胞は、動物細胞またはヒト細胞であり得、そして自己、異種、または外因性の細胞であり得る。必要に応じて、これらの細胞は、不死化され得る。免疫学的応答の機会を減少するために、これらの細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するために、カプセル化され得る。カプセル化材料は、典型的に、生体適合性の半浸透性ポリマー性包囲物または膜であり、これらは、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系または周囲の組織からの他の有害な因子による細胞の破壊を防止する。 20

【0221】

本明細書中において議論されるように、単離された細胞集団（例えば、幹細胞、リンパ球、赤血球、軟骨細胞、ニューロンなど）を1つ以上のT S L P R ポリペプチドで処理することが、望ましくあり得る。このことは、細胞膜に対して透過性の形態である場合には、単離された細胞をこのポリペプチドに直接曝露することによって達成され得る。

【0222】

本発明のさらなる実施形態は、治療ポリペプチドのインビトロ産生と、遺伝子治療または細胞治療による治療ポリペプチドの産生および送達との両方のための、細胞および方法（例えば、相同組換えおよび/または他の組換え産生方法）に関する。相同組換えおよび他の組換えの方法を使用して、通常は転写に対してサイレントなT S L P R 遺伝子または過少発現される遺伝子を含む細胞を改変し得、これによって、治療有効量のT S L P R ポリペプチドを発現する細胞を産生し得る。 30

【0223】

相同組換えは、もともとは、遺伝子を標的化して転写活性な遺伝子における変異を誘導するか、または修正するために開発された技術である。K u c h e r l a p a t i , 1 9 8 9 , P r o g . i n N u c l . A c i d R e s . & M o l . B i o l . 3 6 : 3 0 1 。基本的な技術が、特定の変異を哺乳動物ゲノムの特定の領域に導入するため（T h o m a s ら、1 9 8 6 , C e l l 4 4 : 4 1 9 - 2 8 ; T h o m a s および C a p e c c h i , 1 9 8 7 , C e l l 5 1 : 5 0 3 - 1 2 ; D o e t s c h m a n ら、1 9 8 8 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 8 5 : 8 5 8 3 - 8 7)、または欠損遺伝子における特定の変異を修正するため（D o e t s c h m a n ら、1 9 8 7 , N a t u r e 3 3 0 : 5 7 6 - 7 8)の方法として、開発された。例示的な相同組換え技術は、米国特許第5,272,071号；欧州特許第9193051号および同第505500号；PCT/US90/07642、ならびにPCT公開番号WO 91/09955)に記載されている。 40

【0224】

相同組換えによって、ゲノムに挿入されるべきDNA配列は、それを標的DNAに付着さ 50

せることによって、目的の遺伝子の特定の領域に指向され得る。この標的DNAは、ゲノムDNAの領域に相補的（相同）であるヌクレオチド配列である。ゲノムの特定の領域に対して相補的な標的DNAの小さな断片は、DNA複製プロセスの間に、親鎖と接触される。これは、細胞に挿入されてハイブリダイズしたDNAの一般的な特性であり、従って、共有される相同領域を介して、内因性DNAの他の断片と組み換わる。この相補鎖が、変異または異なる配列またはさらなるヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドに付着される場合には、これはまた、この組換えの結果として新たに合成された鎖に組み込まれる。ブルーフリーディング機能の結果として、DNAの新たな配列がテンプレートとして働くことが可能である。従って、移入されたDNAは、ゲノムに組み込まれる。

【0225】

TSLPRポリペプチドと相互作用し得るかまたはその発現を制御し得るDNAの領域（例えば、隣接配列）が、標的DNAのこれらの断片に付着する。例えば、プロモーター/エンハンサーエレメント、サプレッサ、または外因性転写調節エレメントが、意図される宿主細胞のゲノムにおいて、所望のTSLPRポリペプチドをコードするDNAの近位に、このDNAの転写に影響を与えるに十分な配向で、挿入される。制御エレメントは、この宿主細胞ゲノムに存在するDNAの部分を制御する。従って、所望のTSLPRポリペプチドの発現は、TSLPR遺伝子自体をコードするDNAのトランスフェクションによってではなく、むしろ、TSLPR遺伝子の転写のための認識可能なシグナルを有する内因性遺伝子配列を提供するDNA調節セグメントと結合した標的DNA（目的の内因性遺伝子と相同の領域を含む）の使用によって、達成され得る。

【0226】

例示的な方法において、細胞における所望の標的遺伝子（すなわち、所望の内因性細胞遺伝子）の発現は、予め選択された部位における細胞ゲノムへの相同組換えを介して、少なくとも調節配列、エキソン、およびスプライスドナー部位を含むDNAの導入によって、変更される。これらの構成成分は、新たな転写ユニットの産生を実際に生じるような様式で、染色体（ゲノム）DNAに導入される（ここで、このDNA構築物に存在する調節配列、エキソン、およびスプライスドナー部位は、この内因性遺伝子に作動可能に連結する）。染色体DNAへのこれらの構成成分の導入の結果として、所望の内因性遺伝子の発現が変化する。

【0227】

変化された遺伝子発現は、本明細書中で記載されるように、通常は得られたままの細胞においてサイレントな（発現されていない）遺伝子の活性化（または発現させる）、ならびに得られたままの細胞において生理学的に有意なレベルでは発現されない遺伝子の発現の増加を包含する。この実施形態はさらに、調節または誘導のパターンを変化させる工程を包含し、その結果、これは、得られたままの細胞において生じる調節または誘導のパターンとは異なり、そして得られたままの細胞において発現される遺伝子の発現を低減（除去を含む）させる。

【0228】

細胞の内在性TSLPR遺伝子からのTSLPRポリペプチドの産生を増加するかまたはこれを引き起こすために相同組換えが使用され得る1つの方法は、最初に、相同性組換えを使用して、部位特異的組換え系由来の組換え配列（例えば、Cre/loxP、FLP/FRT）（Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5: 521-27; Sauer, 1993, Methods Enzymol., 225: 890-900）を、細胞の内在性ゲノムTSLPRポリペプチドコード領域の上流（すなわち、5'）に配置する工程を包含する。ゲノムTSLPRポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された部位に対して相同性の組換え部位を含むプラスミドは、適切なリコンビナーゼ酵素と共に、改変された細胞株に導入される。このリコンビナーゼによって、プラスミドは、このプラスミドの組換え部位を介して、この細胞株のゲノムTSLPRポリペプチドコード領域のすぐ上流に位置する組換え部位に組込まれ得る（BaubonisおよびSauer, 1993, Nucleic Acids Res. 21: 202

10

20

30

40

50

5 - 29 ; O'Garmanら、1991, Science 251:1351-55)。転写を増加させることが知られている任意の隣接配列(例えば、エンハンサー/プロモーター、イントロン、翻訳エンハンサー)は、このプラスミド中に適切に配置される場合、細胞の内在性TSLPR遺伝子からの新たな(de novo)または増加したTSLPRポリペプチド産生を生じる新たなまたは改変された転写単位を作製するような様式で一体化する。

【0229】

部位特異的組換え配列が細胞の内在性ゲノムTSLPRポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された細胞株を使用するさらなる方法は、細胞株のゲノムの他の位置に第2の組換え部位を導入するために相同性組換えを使用することである。適当なリコンビナーゼ酵素は、次いで、二組換え部位細胞株に導入され、組換え現象(欠失、転化、および転移)を生じ(Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5:521-27; Sauer, 1993, Methods Enzymol., 225:890-900)、これは、細胞の内在性TSLPR遺伝子からの新規なまたは増加したTSLPRポリペプチド産生を生じる新しいかまたは改変された転写ユニットを作製する。

10

【0230】

細胞の内在性TSLPR遺伝子からのTSLPRポリペプチドの発現を増加するため、または引き起こすためのさらなるアプローチは、細胞の内在性TSLPR遺伝子からの新たなまたは増加したTSLPRポリペプチドの産生を生じる様式で、遺伝子(例えば、転写因子)の発現を増加するかまたは引き起こし、そして/または遺伝子(例えば、転写リプレッサ)の発現を減少する工程を包含する。この方法は、天然に存在しないポリペプチド(例えば、転写因子ドメインに融合した部位特異的DNA結合ドメインを含むポリペプチド)を、細胞の内在性TSLPR遺伝子からの新たなまたは増加したTSLPRポリペプチドの産生が起こるように、細胞に導入する工程を包含する。

20

【0231】

本発明はさらに、標的遺伝子の発現を変化させる方法において有用なDNA構築物に関する。特定の実施形態において、代表的なDNA構築物は、以下を含む:(a)1つ以上の標的配列、(b)調節配列、(c)エキソン、および(d)不对スプライスドナー部位。DNA構築物中の標的配列は、エレメント(a)~(d)の細胞中の標的遺伝子への組込みを指向し、その結果、これらのエレメント(b)~(d)は、内在性標的遺伝子の配列に作動可能に連結される。別の実施形態において、DNA構築物は、以下を含む:(a)1つ以上の標的配列、(b)調節配列、(c)エキソン、(d)スプライスドナー部位、(e)イントロン、および(f)スプライスアクセプター部位。ここで、標的配列は、エレメント(a)~(f)の組込みを指向し、その結果、これらのエレメント(b)~(f)は、内在性遺伝子に作動可能に連結される。標的配列は、相同性組換えが生じる細胞染色体DNAの予め選択された部位に対して相同性である。この構築物において、エキソンは、一般的に、調節配列の3'であり、そしてスプライスドナー部位は、このエキソンの3'である。

30

【0232】

特定の遺伝子の配列(例えば、本明細書中で記載されるTSLPRポリペプチドの核酸配列)が公知である場合、遺伝子の選択された領域に対して相補的なDNAの部分は、合成されるか、またはそうでなければ、例えば、目的の領域に結合している特定の認識部位におけるネイティブのDNAの適切な制限等によって得られ得る。この部分は、細胞に挿入された際に、標的配列として働き、そしてそのゲノム内の相同性領域にハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションが、DNA複製の間に生じる場合、このDNAの部分、およびそれに結合した任意のさらなる配列は、Okazakiフラグメントとして作用し、そしてDNAの新たに合成された娘鎖に組み込まれる。従って、本発明は、TSLPRポリペプチドをコードするヌクレオチドを含み、このヌクレオチドは、標的配列として使用され得る。

40

【0233】

50

T S L P R ポリペプチド細胞療法（例えば、T S L P R ポリペプチドを産生する細胞の移植）もまた企図される。この実施形態は、生物学的に活性な形態のT S L P R ポリペプチドを合成および分泌し得る細胞を移植する工程を包含する。このようなT S L P R ポリペプチド産生細胞は、T S L P R ポリペプチドの天然のプロデューサーである細胞であり得るか、または組換え細胞であって、そのT S L P R ポリペプチドを産生する能力が、所望のT S L P R ポリペプチドをコードする遺伝子またはT S L P R ポリペプチドの発現を増大する遺伝子で形質転換することによって増大された、組換え細胞であり得る。このような改変は、遺伝子を送達し、その発現および分泌を促進するために適切なベクターによって達成され得る。T S L P R ポリペプチドを投与されている患者における潜在的な免疫学的反応を最小化するために、外来のポリペプチドの投与を伴い得る場合、T S L P R ポリペプチドを産生する天然の細胞が、ヒト起源であり、そしてヒトT S L P R ポリペプチドを産生することが好ましい。同様に、T S L P R ポリペプチドを産生する組換え細胞が、ヒトT S L P R ポリペプチドをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換されることが好ましい。

【0234】

移植細胞は、周辺組織の浸潤を回避するようにカプセル化され得る。ヒトまたは非ヒト動物細胞は、生体適合性の半透性ポリマー封入物または膜（これは、T S L P R ポリペプチドの放出を可能にするが、患者の免疫系または周辺組織からの他の有害な因子による細胞の崩壊を防止する）の形態で患者に移植され得る。あるいは、T S L P R ポリペプチドをエキソピボで産生するように形質転換された患者自身の細胞が、このようなカプセル化を伴わずに、患者に直接移植され得る。

【0235】

生存細胞をカプセル化するための技術は当該分野で公知であり、そしてカプセル化された細胞の調製および患者へのそれらの移植は、慣用的に達成され得る。例えば、Baetgerら（PCT公開WO95/05452およびPCT/US94/09299）は、生物学的に活性な分子の効率的な送達のために遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。このカプセルは、生体適合性であり、そして容易に回収可能（retrievable）である。このカプセルは、哺乳動物宿主に移植された際に、インピボでダウンレギュレーションに供されないプロモーターに作動可能に連結された生物学的に活性な分子をコードするDNA配列を含む組換えDNA分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化する。このデバイスは、レシピエント内の特定の部位への生存細胞由来の分子の送達を提供する。さらに、米国特許第4,892,538号；同第5,011,472号；および同第5,106,627号を参照のこと。生存細胞をカプセル化するための系は、PCT公開WO91/10425（Aebischerら）に記載される。PCT公開WO91/10470（Aebischerら）；Winnら、1991, Exper. Neurol. 113:322-29；Aebischerら、1991, Exper. Neurol. 111:269-75；およびTrescoら、1992, ASAI 38:17-23もまた参照のこと。

【0236】

T S L P R ポリペプチドのインピボおよびインピトロの遺伝子治療送達もまた想定される。遺伝子治療技術の一例は、構成的プロモーターまたは誘導的プロモーターに作動可能に連結され得る、T S L P R ポリペプチドをコードするT S L P R 遺伝子（ゲノムDNA、cDNAおよび/または合成DNAのいずれか）を使用して、「遺伝子治療DNA構築物」を形成することである。このプロモーターは、内因性T S L P R 遺伝子に対して同種または異種であり得るが、ただし、これは、構築物が挿入される細胞または組織型において活性である。遺伝子治療DNA構築物の他の成分は、必要に応じて、部位特異的組込みのために設計されるDNA分子（例えば、相同組換えのために有用な内因性配列）、組織特異的プロモーター、エンハンサーまたはサイレンサー、親細胞を超える選択的優性を提供し得るDNA分子、形質転換された細胞を同定するための標識として有用なDNA分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子（例えば、細胞標的化について）、細胞特異的内

部移行因子、ベクターからの発現を増大する転写因子、およびベクターの産生を可能にする因子を含み得る。

【0237】

次いで、遺伝子治療DNA構築物は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを使用して（エキソビボまたはインビボのいずれかで）細胞に導入され得る。遺伝子治療DNA構築物を導入するための1つの方法は、本明細書中に記載されるようなウイルスベクターによる。特定のベクター（例えば、レトロウイルスベクター）は、DNA構築物を細胞の染色体DNAに送達し、そしてこの遺伝子は、染色体DNAに組み込まれ得る。他のベクターは、エピソームとして機能し、そして遺伝子治療DNA構築物は、細胞質に残る。

【0238】

さらに他の実施形態において、調節エレメントが、標的細胞におけるTSLPR遺伝子の制御された発現のために含められ得る。このようなエレメントは、適切なエフェクターに応答してオンになる（turn on）。このようにして、治療的ポリペプチドは、所望の場合に発現され得る。1つの従来の制御手段は、低分子結合ドメインおよび生物学的プロセスを開始し得るドメインを含むキメラタンパク質（例えば、DNA結合タンパク質または転写活性化タンパク質）を二量化する低分子二量化剤またはラパログ（rapalog）の使用を包含する（PCT公開WO96/41865、WO97/31898およびWO97/31899を参照のこと）。タンパク質の二量化は、導入遺伝子の転写を開始するために使用され得る。

【0239】

代替の調節技術は、目的の遺伝子から発現されたタンパク質を、凝集体またはクラスターとして細胞の内側に貯蔵する方法を使用する。目的の遺伝子は、小胞体における凝集タンパク質の保持を生じる、条件的凝集ドメインを含む融合タンパク質として発現される。貯蔵されたタンパク質は安定であり、そして細胞の内側で不活性である。しかし、このタンパク質は、条件的凝集ドメインを除去する薬物（例えば、低分子リガンド）を投与することによって放出され得、それにより、凝集体またはクラスターを特異的に破壊し、その結果、このタンパク質は細胞から分泌され得る。Aridorら、2000, Science 287: 816-17およびRiveraら、2000, Science 287: 826-30を参照のこと。

【0240】

他の適切な制御手段または遺伝子スイッチとしては、本明細書中で記載される系が挙げられるが、これらに限定されない。ミフェプリストン（Mifepristone）（RU486）は、プロゲステロンアンタゴニストとして使用される。改変されたプロゲステロンレセプターリガンド結合ドメインのプロゲステロンアンタゴニストへの結合は、2つの転写因子の二量体を形成することによって、転写を活性化し、次いで、これは核に至り、DNAに結合する。このリガンド結合ドメインは、天然のリガンドに結合するレセプターの能力を排除するように改変される。改変されたステロイドホルモンレセプター系はさらに、米国特許第5,364,791号、ならびにPCT公開WO96/40911およびWO97/10337に記載される。

【0241】

さらに別の制御系は、エクジソンレセプター（細胞質レセプター）に結合し、そしてこれを活性化するエクジソン（ショウジョウバエステロイドホルモン）を使用する。次いで、このレセプターは核にトランスロケーションし、特定のDNA応答エレメント（エクジソン応答性遺伝子由来のプロモーター）に結合する。エクジソンレセプターは、トランス活性化ドメイン、DNA結合ドメイン、およびリガンド結合ドメインを含み、転写を開始する。エクジソン系はさらに、米国特許第5,514,578号、およびPCT公開WO97/38117、WO96/37609、およびWO93/03162に記載される。

【0242】

別の制御手段は、陽性テトラサイクリン制御可能トランス活性化因子を使用する。この系は、転写を活性化するポリペプチドに連結された変異tetレプレッサタンパク質DNA

10

20

30

40

50

結合ドメイン（逆テトラサイクリン制御トランス活性化因子タンパク質を生じさせる変異 *tetR*-4アミノ酸の変化、すなわち、これは、テトラサイクリンの存在下で *tet* オペレーターに結合する）を含む。このような系は、米国特許第 5,464,758 号、同第 5,650,298 号、および同第 5,654,168 号に記載される。

【0243】

さらなる発現制御系および核酸構築物は、米国特許第 5,741,679 号および同第 5,834,186 号 (Innovir Laboratories Inc.) に記載される。

【0244】

インビボ遺伝子治療は、*TSLPR* ポリペプチドをコードする遺伝子を、*TSLPR* 核酸分子の局所的注射によって、または他の適切なウイルスもしくは非ウイルス性の送達ベクターによって、細胞に導入することにより達成され得る。Hefiti, 1994, *Neurobiology* 25:1418-35。例えば、*TSLPR* ポリペプチドをコードする核酸分子は、標的細胞への送達のためのアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターに含まれ得る (例えば、Johnson, PCT 公開 WO 95/34670; PCT 出願番号 PCT/US 95/07178 を参照のこと)。組換え AAV ゲノムは、典型的に、機能的プロモーターおよびポリアデニル化配列に作動可能に連結した、*TSLPR* ポリペプチドをコードする DNA 配列に隣接する AAV 逆末端反復を含む。

10

【0245】

代替の適切なウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス、肝炎ウイルス、パルボウイルス、パポウイルス、ボックスウイルス、アルファウイルス、コロナウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、およびパピローマウイルスのベクターが挙げられるが、これらに限定されない。米国特許第 5,672,344 号は、組換え神経栄養性 HSV-1 ベクターを含むインビボウイルス媒介遺伝子移入系を記載する。米国特許第 5,399,346 号は、治療タンパク質をコードする DNA セグメントを挿入するためにインビトロで処理されたヒト細胞の送達によって、治療タンパク質を患者に提供するためのプロセスの例を提供する。遺伝子治療技術の実施のためのさらなる方法および材料は、米国特許第 5,631,236 号 (アデノウイルスベクターに関する)、同第 5,672,510 号 (レトロウイルスベクターに関する)、同第 5,635,399 号 (サイトカインを発現するレトロウイルスベクターに関する) に記載される。

20

30

【0246】

非ウイルス送達法としては、リポソーム媒介移入、裸の DNA 送達 (直接注射)、レセプター媒介移入 (リガンド-DNA 複合体)、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、および微粒子銃 (microparticle bombardment) (例えば、遺伝子銃 (gene gun)) が挙げられるが、これらに限定されない。遺伝子治療の材料および方法はまた、誘導的プロモーター、組織特異的エンハンサー-プロモーター、部位特異的組込みのために設計された DNA 配列、親細胞を超える選択的優性を提供し得る DNA 配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブな選択系および発現制御系 (安全性の指標)、細胞特異的結合因子 (細胞標的化のため)、細胞特異的インターナリゼーション因子、およびベクターによる発現を増大する転写因子ならびにベクターの製造方法を含み得る。遺伝子治療技術の実施のためのこのようなさらなる方法および材料は、米国特許第 4,970,154 号 (エレクトロポレーション技術に関する)、同第 5,679,559 号 (遺伝子送達のためのリポタンパク質含有系を記載する)、同第 5,676,954 号 (リポソームキャリアに関する)、同第 5,593,875 号 (リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を記載する)、および同第 4,945,050 号 (生物学的に活性な粒子が一定の速度で細胞に噴霧され、それによりこの粒子がこの細胞の表面に浸透し、そしてこの細胞の内側に組み込まれるプロセスを記載する)、および PCT 公開 WO 96/40958 (核リガンドに関する) に記載される。

40

【0247】

50

T S L P R 遺伝子治療または細胞治療は、同一または異なる細胞（単数または複数）における1つ以上のさらなるポリペプチドの送達をさらに含み得ることもまた企図される。このような細胞は、患者に別々に導入され得るか、またはこの細胞は、単一の移植可能デバイス（例えば、上記のカプセル化膜）に含められ得るか、あるいはこの細胞は、ウイルスベクターによって別々に改変され得る。

【0248】

遺伝子治療による細胞における内因性 T S L P R ポリペプチドの発現を増加する手段は、T S L P R ポリペプチドプロモーターに1つ以上のエンハンサーエレメントを挿入することであり、ここでエンハンサーエレメントは、T S L P R 遺伝子の転写活性を増加させるように作用し得る。使用されるエンハンサーエレメントは、この遺伝子を活性化することを所望する組織に基づいて選択される（その組織においてプロモーター活性化を与えることが知られているエンハンサーエレメントが選択される）。例えば、T S L P R ポリペプチドをコードする遺伝子が T 細胞において「オンに変わる（turn on）」場合、I c k プロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。ここで、付加される転写エレメントの機能的部分は、標準的なクローニング技術を使用して、T S L P R ポリペプチドプロモーターを含む DNA のフラグメントに挿入され得る（そして必要に応じて、ベクターならびに / または 5' および / もしくは 3' 隣接配列に挿入される）。「相同組換え構築物」として公知のこの構築物は、次いで、エキソピボまたはインピボのいずれかで、所望の細胞に導入され得る。

10

【0249】

遺伝子治療はまた、内因性プロモーターのヌクレオチド配列を改変することによって、T S L P R ポリペプチド発現を減少させるために使用され得る。このような改変は、典型的に、相同組換え方法によって達成される。例えば、不活性化のために選択された T S L P R 遺伝子のプロモーターの全てまたは一部を含む DNA 分子は、転写を調節するプロモーターの断片を除去および / または置換するように操作され得る。例えば、プロモーターの転写活性化因子の T A T A ボックスおよび / または結合部位は、標準的な分子生物学的技術を使用して欠失され得；このような欠失は、プロモーター活性を阻害し得、それによって、対応する T S L P R 遺伝子の転写を阻止し得る。プロモーターにおける T A T A ボックスまたは転写活性化因子結合部位の欠失は、T S L P R ポリペプチドプロモーター（調節される T S L P R 遺伝子と同じかまたは関連の種由来）のすべてまたは関連の部分を含む DNA 構築物を生成することによって達成され得、ここで、1つ以上の T A T A ボックスおよび / または転写活性化因子結合部位のヌクレオチドは、1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、および / または挿入によって変異される。結果として、T A T A ボックスおよび / または活性化因子結合部位は、活性を減少するか、または完全に不活性化される。この構築物（これはまた、典型的に、改変されたプロモーターセグメントに隣接したネイティブの（内因性）5' および 3' DNA 配列に対応する少なくとも約 500 塩基の DNA を含む）は、直接または本明細書中に記載されるようなウイルスベクターを介してのいずれかで、適切な細胞に（エキソピボまたはインピボのいずれかで）導入され得る。典型的に、細胞のゲノム DNA へのこの構築物の組込みは、相同組換えを介し、ここで、このプロモーター構築物の 5' および 3' DNA 配列は、内因性染色体 DNA へのハイブリダイゼーションによって、改変プロモーター領域を組み込むのを補助するように作用し得る。

20

30

40

【0250】

（治療的用途）

T S L P R 核酸分子、ポリペプチド、ならびにそれらのアゴニストおよびアンタゴニストは、多数の疾患、障害または状態（T S L P 関連の疾患、障害、または状態を含む）を処置、診断、回復または予防するために使用され得る。T S L P 関連の疾患、障害、または状態は、B 細胞の発生、T 細胞の発生、T 細胞レセプター遺伝子の再配列、または S t a t 5 転写因子の調節に関与し得る。T S L P の所望されないレベルによって引き起こされるかまたは媒介される疾患は、本発明の範囲内に含まれる。所望されないレベルとしては、T S L P の過剰なレベル、および T S L P の正常以下のレベルが挙げられる。

50

【0251】

T S L P R ポリペプチドアゴニストおよびアンタゴニストは、T S L P R ポリペプチド活性を調節し、T S L P R ポリペプチドの成熟形態の少なくとも1つの活性を増加または減少する分子を含む。アゴニストまたはアンタゴニストは、T S L P R ポリペプチドと相互作用し、それによりその活性を調節する補因子（例えば、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質または低分子量分子）であり得る。潜在的なポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストは、タンパク質の細胞外ドメインの一部または全てを含むT S L P R ポリペプチドの可溶性または膜結合形態のいずれかと反応する抗体を含む。T S L P R ポリペプチド発現を調節する分子は、典型的に、発現のアンチセンス制御因子として作用し得るT S L P R ポリペプチドをコードする核酸を含む。

10

【0252】

T S L P R の核酸分子、ポリペプチド、ならびにそのアゴニストまたはアンタゴニストは、処置される状態に適切であるように、1つ以上のサイトカイン、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤および/または化学療法剤と組み合わせて（同時にまたは引き続き）使用され得る。

【0253】

望ましくないレベルのT S L P R ポリペプチドによって引き起こされるかまたは媒介される他の疾患または障害は、本発明の範囲内に含まれる。望ましくないレベルとしては、過度のレベルのT S L P R ポリペプチド、および正常以下のレベルのT S L P R ポリペプチドが挙げられる。

20

【0254】

（T S L P R 核酸およびT S L P R ポリペプチドの使用）

本発明の核酸分子（それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む）を使用して、T S L P R 遺伝子および関連遺伝子の染色体上の位置をマッピングし得る。マッピングは、当該分野で公知の技術（例えば、P C R 増幅およびインサイチュハイブリダイゼーション）により行われ得る。

【0255】

T S L P R 核酸分子（それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む）は、哺乳動物組織または体液サンプル中のT S L P R 核酸分子の存在について、定性的または定量的のいずれかで試験するための、診断アッセイにおけるハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得る。

30

【0256】

他の方法はまた、1つ以上のT S L P R ポリペプチドの活性を阻害することが所望される場合に使用され得る。このような阻害は、発現制御配列（三重らせん形成）またはT S L P R m R N A に相補的でありかつ発現制御配列（三重らせん形成）またはT S L P R m R N A にハイブリダイズする核酸分子によりもたらされ得る。例えば、アンチセンスD N A またはR N A 分子（これらは、T S L P R 遺伝子の少なくとも一部に相補的である配列を有する）は、細胞中に導入され得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示されるT S L P R 遺伝子の配列を使用して、利用可能な技術により設計され得る。代表的には、このようなアンチセンス分子の各々は、選択された各T S L P R 遺伝子の開始部位（5'末端）に相補的である。このアンチセンス分子が次いで、対応するT S L P R m R N A にハイブリダイズする場合、このm R N A の翻訳は、防止されるかまたは低減される。アンチセンスインヒビターは、細胞または生物におけるT S L P R ポリペプチドの減少または不在に関連する情報を提供する。

40

【0257】

あるいは、遺伝子治療を使用して、1つ以上のT S L P R ポリペプチドの優性ネガティブインヒビターを作製し得る。この状況において、各選択されたT S L P R ポリペプチドの変異体ポリペプチドをコードするD N A は、調製され得、そして本明細書中に記載されるウイルスまたは非ウイルスの方法のいずれかを使用して患者の細胞中に導入され得る。このような変異体の各々は、代表的にはその生物学的役割において内因性ポリペプチドと競

50

合するように設計される。

【0258】

さらに、T S L P R ポリペプチド（生物学的に活性でも活性でなくても）は、免疫原として使用され得、すなわち、これらのポリペプチドは、それに対して抗体が誘発され得る少なくとも1つのエピトープを含有する。T S L P R ポリペプチドに結合する選択的結合因子（本明細書中に記載されるように）は、インビボおよびインビトロでの診断目的のために使用され得、これらの目的としては、体液サンプルまたは細胞サンプル中のT S L P R ポリペプチドの存在を検出するための標識された形態での使用を含むが、これに限定されない。これらの抗体をまた使用して、本明細書中に列挙される疾患および障害を含む多数の疾患および障害を、予防、処置、または診断し得る。これらの抗体は、T S L P R ポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を低減するかまたは遮断するように、T S L P R ポリペプチドに結合し得るか、またはポリペプチドに結合してT S L P R ポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を増加し得る（T S L P R ポリペプチドの薬物動態を増加させることによるものを含む）。

10

【0259】

本発明のマウスおよびヒトのT S L P R 核酸はまた、対応する染色体T S L P R ポリペプチド遺伝子を単離するために有用なツールである。例えば、T S L P R 配列を含むマウス染色体D M A は、ノックアウトマウスを構築し、それによりT S L P R ポリペプチドのインビボでの役割の試験を可能にするために用いられ得る。ヒトT S L P R ゲノムD N A は、遺伝性組織変性疾患を同定するために用いられ得る。

20

【0260】

以下の実施例は、例示目的のみのために意図され、本発明の範囲をどちらにしても限定するとは解釈されるべきではない。

【0261】

（実施例1：マウスおよびヒトT S L P R ポリペプチド遺伝子のクローニング）

概して、S a m b r o o k ら（前出）に記載されるような材料および方法を、マウスおよびヒトT S L P R ポリペプチドをコードする遺伝子をクローン化および分析するために使用した。

【0262】

マウスT S L P R ポリペプチドをコードする配列を、エリスロポエチンレセプターの細胞質ドメインに対応する配列を用いて、E S T データベースのB L A S Tサーチにおいて同定した。いくつかの重複するマウスE S T（これは、新規なI型サイトカインレセプター分子をコードする）をB L A S Tサーチにおいて得た。これらの配列によりコードされるサイトカインレセプターの細胞質ドメインは、共通するサイトカインレセプター鎖（ α ）、エリスロポエチンレセプター、およびI L - 9レセプター鎖の細胞質ドメインに対して有意な類似性を共有することが見出された。

30

【0263】

この共通するサイトカインレセプター鎖は、I L - 2、I L - 4、I L - 7、I L - 9、およびI L - 15についてのレセプターの必須のサブユニットである（N o g u c h i ら、1993、S c i e n c e 262：1877-80；K o n d o ら、1994、S c i e n c e 263：1453-54；K o n d o ら、1993、S c i e n c e 262：1874-77；R u s s e l l ら、1994、S c i e n c e 266：1042-45；T a k e s h i t a ら、1992、S c i e n c e 257：379-82；R u s s e l l ら、1993、S c i e n c e 262：1880-83；G i r i ら、1994、E M B O J . 13：2822-30；K i m u r a ら、1995、I n t . I m m u n o l . 7：115-20）。ヒトにおける α の変異は、X連鎖重症複合免疫不全を生じ得る（N o g u c h i ら、1993、C e l l 73：147-57；L e o n a r d ら、1995、I m m u n o l . R e v . 148：97-114）。

40

【0264】

B L A S T 検索において同定されたいずれのE S T 配列も、T S L P R ポリペプチドのオ

50

オープンリーディングフレーム全体を含んでいなかったため、マウス胚ライブラリーをスクリーニングして、全長cDNAを得た。最も長いインサートを含むポジティブクローンをを用いて、標準的方法によりプラスミドDNAを調製した。このコロニー由来のcDNAインサートは、長さが2kbであった。DNA配列分析により、このクローンが、TSLPRポリペプチドのリーディングフレーム全体を含んでいることを確認した。

【0265】

マウスTSLPRポリペプチドについての全長cDNAの配列分析により、この遺伝子は、1110bpのオープンリーディングフレーム(370アミノ酸のタンパク質をコードし、そのアミノ末端に長さ17アミノ酸の潜在的なシグナルペプチドを有する)を含むことが示された(図1A-1B; 推定シグナルペプチドは下線により示される)。このオープンリーディングフレームは、2つの潜在的N結合型グリコシル化部位、および1つのチロシン残基を含む104アミノ酸の細胞質ドメインを有するI型膜貫通タンパク質をコードすることが見出された。

10

【0266】

対照的に、マウス_cは、369アミノ酸を含み、2つのチロシン残基を含む86アミノ酸の細胞質ドメインを有する(Kumakira, 1993, Biochem. Biophys. Res. Commun. 193:356-63; Caoら, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8464-68; Kobayashira, 1993: Gene 130:303-04)。図2は、マウスTSLPRポリペプチド(上の配列)およびマウス_c(下の配列)のアミノ酸配列アライメントを例示する。マウスTSLPRポリペプチドは、アミノ酸レベルで、_cと26%の配列同一性および47%の配列類似性を共有することが見出された。マウスTSLPRポリペプチドの配列は、システインのわずか1対が保存され、W-S-X-W-S(配列番号15)モチーフが、W-T-A-V-T(配列番号16)モチーフにより置換されているという点で、I型サイトカインレセプターについて、いくらか代表的ではない。マウスTSLPRポリペプチドの推定分子量は、37kDである。

20

【0267】

ヒトTSLPRポリペプチドをコードする配列を、クエリー配列としてマウスTSLPR核酸配列を用いて、cDNA配列の私設データベース(Amgen, Thousand Oaks, CA)のBLASTサーチにおいて同定した。ヒトcDNA配列を含み、マウスTSLPR核酸配列と最も大きな相同性を共有する2つのクローンを、この検索において同定した: 9604927(配列番号10)および9508990(配列番号11)。ヒトTSLPRポリペプチドの全長cDNA(クローン9604927に含まれる)の配列分析により、ヒトTSLPR遺伝子が1113bpのオープンリーディングフレーム(371アミノ酸のタンパク質をコードし、そのアミノ末端に長さ22アミノ酸の潜在的シグナルペプチドを有する)を含むことが示された(図3A-3B; 推定シグナルペプチドは、下線により示される)。

30

【0268】

クローン9508990は、379アミノ酸のタンパク質をコードする1137bpのオープンリーディングフレームを含む(図4A-4B)。このクローンは、本質的には、全長ヒトTSLPRポリペプチド配列および、FLAGエピトープに対応するカルボキシ末端にさらなる8アミノ酸を含む。図5は、マウスTSLPRポリペプチド(上の配列)とヒトTSLPRポリペプチド(下の配列)とのアミノ酸配列アラインメントを示す。マウスおよびヒトTSLPR核酸およびアミノ酸配列の有用性は、TSLPにより利用されるシグナル伝達経路の解明をさらに補助する。

40

【0269】

(実施例2: TSLPRポリペプチドの発現)

マウスTSLPRのオープンリーディングフレームをコードするcDNA構築物を、³⁵SメチオニンおよびSDS-PAGEにより分離された産物の存在下で、インビトロで転写および翻訳した。図6Aは、約40kDの単一の種が得られたゲルのオートラジオグラ

50

ムを示す。

【0270】

図6Bは、マウスTSLPRポリペプチドの細胞外ドメインに対して惹起されたウサギポリクローナル抗血清を用いた、増殖因子依存性プレB細胞株NAG8/7におけるマウスTSLPRポリペプチドの免疫沈降を示す。ウサギポリクローナル抗血清を、マウスTSLPRポリペプチド-グルタチオンS-トランスフェラーゼ融合タンパク質(これは、pGEX4T2発現ベクター(Pharmacia)にクローニングされ、細菌において発現された)に対して生成した。代謝標識の前に、NAG8/7細胞を、10%ウシ胎仔血清、抗生物質およびTSLPを補充したRPMI中で増殖させた。

【0271】

NAG8/7細胞を、³⁵S-メチオニンおよびシステインで代謝標識し、50mM Tris、pH7.4、150mM NaCl、1% Triton X-100、およびプロテアーゼインヒビター中で溶解し、この溶解物をウサギポリクローナル抗血清(レーン2)または免疫前血清(レーン1)のいずれかとともに一晚インキュベートした。この免疫複合体をプロテインGセファロースに捕捉し、溶解緩衝液で洗浄し、次いで、SDS-PAGEにより分離した。ポリクローナル抗血清は、プレB細胞株NAG8/7における約50kDの広いバンドを特異的に免疫沈降した(図6B)。インビトロ翻訳により生成された産物と比較して、より大きなサイズの免疫沈降した産物は、細胞外ドメインにおけるN結合型糖質部分の付加と一致した。トランスフェクト293細胞およびいくつかの造血細胞株(すなわち、32D、BaF3、およびWEHI-3)のフローサイトメトリック分析により、マウスTSLPRが細胞表面で発現されたことが確認された。

【0272】

(実施例3: TSLPR mRNAの発現)

マウスTSLPRの組織分布を、ノーザンブロット分析によって試験した。複数のマウス組織ノーザンブロット(Clontech, Palo Alto, CA)を、標準的な技術を用いて、³²P標識したTSLPR cDNAプローブでスクリーニングした。マウスTSLPR転写物を、試験した組織のほぼ全てにおいて検出した。最も高いレベルの発現は、肺、肝臓および精巣において検出された(図6C)。低下したレベルの発現は、心臓、脳、脾臓、および骨格菌において検出された。約2kbおよび2.2kbの2つの転写物をいくつかの組織で検出したのに対して、約2kbの単一の転写物のみが他の組織において検出された。マウスTSLPR mRNAの広い組織分布は、³²Pについて観察された発現の比較的制限されたリンパ-造血パターンとは異なる。

【0273】

TSLPR mRNAの発現を、以下のようにインサイチュハイブリダイゼーションによって局在化し得る。正常胚および成体マウス組織のパネルを4%パラホルムアルデド中で固定し、パラフィンに包埋し、そして5μmに切片化した。切片化した組織を、0.2M HCl中で透過化処理し、プロテイナーゼKで消化し、そしてトリエタノールアミンおよび無水酢酸でアセチル化する。切片を、ハイブリダイゼーション溶液(300mM NaCl、20mM Tris-HCl、pH8.0、5mM EDTA、1xデンハート溶液、0.2% SDS、10mM DTT、0.25mg/ml tRNA、25μg/ml ポリA、25μg/ml ポリCおよび50%ホルムアミド)中で1時間60分でプレハイブリダイズし、次いで、10%デキストランおよび2x10⁴cpm/μlの³³P-標識アンチセンスリボプローブ(ヒトTSLPR遺伝子に相補的)を含有する同じ溶液中で60分で一晩ハイブリダイズする。標準的技術を用いて、ヒトTSLPR cDNA配列を含有するクローンのインビトロ転写によって、このリボプローブを得る。

【0274】

ハイブリダイゼーション後、切片を、ハイブリダイゼーション溶液中でリンスし、RNaseAで処理してハイブリダイズしていないプローブを消化し、次いで0.1xSSC中で55分間で30分間洗浄する。次いで、切片をNTB-2エマルジョン(Kodak, Rochester, NY)に浸し、4°Cで3週間曝し、発色させ、そしてヘマトキシリン

10

20

30

40

50

およびエオシンで対比染色する。組織形態学およびハイブリダイゼーションシグナルを、脳（矢状断面1つおよび冠状断面2つ）、胃腸管（食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、近位結腸、および遠位結腸）、下垂体、肝臓、肺、心臓、脾臓、胸腺、リンパ節、腎臓、副腎、膀胱、膵臓、唾液腺、雄性および雌性生殖器（雌性の卵巣、卵管、および子宮；ならびに雄性の精巣、精巣上体、前立腺、精嚢および輸精管）、BATおよびWAT（皮下、腎臓周囲）、骨（大腿）、皮膚、乳房、および骨格筋についての暗野かつ標準のイルミネーションによって同時に分析する。

【0275】

（実施例4：マウスTSLPRポリペプチドの生物学的活性）

マウスTSLPRポリペプチドとエリスロポエチンレセプターとの間の類似性により、マウスTSLPR（エリスロポエチンレセプター様である）がホモダイマー化により活性化され得ることが示唆された。このことを、c-Kitレセプターの細胞外ドメインおよび膜貫通ドメイン、ならびにマウスTSLPRポリペプチドの細胞質ドメインに由来するキメラ構築物を用いて、増殖アッセイにおいて試験した。この構築物を生成するために、c-Kitの細胞外ドメインおよび膜貫通ドメイン、ならびにTSLPRの細胞質ドメインをPCRにより増幅し、標準的技術を用いてレトロウイルスベクターpMX-IRES-GFPに連結した。

【0276】

IL-2依存性CTLL2細胞を、c-Kit/TSLPRとc-Kit/、c-Kit/とc-Kit/、またはc-Kit/単独をコードする発現構築物で安定に形質転換した。c-Kit/とc-Kit/の構築物は、Nelsonら、1994、Nature 369:333-36に記載されるとおりであった。トランスフェクション後、CTLL2細胞を、IL-2について除去し、48ウェルディッシュに10,000細胞/ウェルで移し、c-Kitについてのリガンドである幹細胞因子(SCF)の存在下および非存在下で増殖させた。細胞を、培養で増殖させて7日後に計数した。

【0277】

図7は、IL-2がSCFにより置換された場合に、キメラc-Kit/TSLPRポリペプチドを安定に発現するCTLL2細胞が増殖できなかったことを示し、このことは、マウスTSLPRポリペプチドの細胞質ドメインの単純なホモダイマー化では、増殖シグナルを誘導するに不十分であることを示唆する。同様の結果が、キメラc-Kit/。ポリペプチドを用いた増殖実験において得られた(Nelsonら、前出)。さらに、CTLL2細胞をc-Kit/TSLPRおよびc-Kit/で同時トランスフェクトした場合、この細胞はなお増殖できなかった。しかし、c-Kit/およびc-Kit/で同時トランスフェクトしたCTLL2細胞は、SCFとのインキュベーション後に増殖できた。このことは、IL-2R鎖の細胞質ドメインが、増殖を開始するためにマウスTSLPRポリペプチドの細胞質ドメインと協同せず、マウスTSLPRポリペプチドが、シグナル伝達に關与する他のいくつかのレセプターとオリゴマー化し得ることを示唆した。

【0278】

マウスTSLPRポリペプチドと。との間の類似性により、マウスTSLPRがIL-2サイトカインサブファミリーのメンバーのいくつかに結合する能力を有し得ることが示唆された。このことを、¹²⁵I標識したIL-2、IL-4、IL-7およびIL-15を用いたアフィニティー標識アッセイにおいて試験した。¹²⁵I標識したサイトカインを添加する前に、293細胞を、。またはマウスTSLPRポリペプチドいずれかの存在下で、サイトカイン特異的サブユニットIL-2R、IL-4R、またはIL-7Rで再構成した。試験したリガンドはいずれも、たとえ。がサイトカイン特異的サブユニットと同時発現した場合にリガンドが効率的に結合したとしても、マウスTSLPRがサイトカイン特異的サブユニットと同時発現した場合に結合を示さなかった。このことは、マウスTSLPRポリペプチドが新規なサイトカインを結合するか、または新規もしくはは試験されていないサブユニットとともに公知のサイトカインを結合するかのいずれ

かであることを示唆した。

【0279】

胸腺間質のリンポエチン (lymphopoietin) (TSLP) は、その生物学的活性が IL-7 の生物学的活性と重なるサイトカインである。TSLP 活性は、元来、胎児肝臓造血前駆細胞由来のマウス IgM⁺ B 細胞の発生を支持する胸腺間質細胞株の馴化培地中で同定された (Friendら、1994、Exp. Hematol. 22: 321-28)。さらに、TSLP は、長期骨髄培養物において B 細胞のリンパ球産生を促進し得、胸腺細胞および成熟 T 細胞の両方を同時刺激し得る (Friendら、前出; Levinら、1999、J. Immunol. 162: 677-83)。

【0280】

IL-7 はまた、これらの活性を有するが (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 は、IgM⁺ 未成熟 B 細胞段階まで B リンパ球産生を促進する一方で、IL-7 は、主に IgM⁻ プレ B 細胞の生成を促進するという点で独特である (Levin et al., 前出; Candeias et al., 1997, Immunity 6: 501-08)。IL-7 および TSLP の重なる生物学的活性についての 1 つのあり得る説明は、TSLP が IL-7 R 鎖を含むレセプターを介してシグナル伝達することである (Levin et al., 前出)。しかし、抗体阻害実験により、TSLP が、その効果を発揮するために IL-7 R 鎖を必要としないことが示された (Levin et al., 前出)。これらの結果は、TSLP が、IL-7 R の存在下でマウス TSLP R ポリペプチドを結合することを示唆した。

【0281】

IL-7 R の存在下での TSLP の TSLP R ポリペプチドへの結合を、アフィニティー標識アッセイにおいて試験した。マウス IL-7 R 、マウス TSLP R ポリペプチド、マウス IL-7 R およびマウス TSLP R ポリペプチド、またはヒト IL-7 R およびマウス TSLP R ポリペプチドについての発現構築物でトランスフェクトした 5×10^6 の 293 細胞に、 $1 - 5 \text{ nM } ^{125}\text{I}$ 標識 TSLP を添加することにより、アフィニティー標識アッセイを行った。IODO-GEN (Pierce, Rockford, IL) および $2 \text{ mCi } ^{125}\text{I}$ を 1 ug の TSLP に添加することにより、ヨウ素化した TSLP を調製した。この方法により、約 $200 - 300 \text{ } \mu\text{Ci} / \mu\text{g}$ の比活性を得た。アフィニティー標識の前に、リン酸カルシウム法 (Eppendorf-5 Prime, Boulder, CO) を用いて 293 細胞を一時的にトランスフェクトした。 ^{125}I -TSLP とともに 2 時間インキュベーションした後に、細胞を $0.1 \text{ mg} / \text{ml}$ のジスクシンイミジルスプレート (Pierce) と架橋し、溶解緩衝液中で溶解し、この溶解物を SDS-PAGE により分離した。

【0282】

図 8 A に示されるように、 ^{125}I -TSLP は、マウス IL-7 R およびマウス TSLP R ポリペプチドのヘテロダイマーに結合した (レーン 4)。上のバンドは、架橋したマウス IL-7 R に対応し、下のバンドは、架橋したマウス TSLP R ポリペプチドに対応する。さらに、 ^{125}I -TSLP はまた、ヒト IL-7 R およびマウス TSLP R ポリペプチドのヘテロダイマーを結合した (レーン 5)。マウス IL-7 R 単独では、TSLP 結合は観察されなかった (レーン 2)。

【0283】

アフィニティー標識アッセイもまた、マウス TSLP R ポリペプチドの FLAG タグ化バージョンを用いて行った。FLAG エピトープに対応する配列を含む 3' プライマーを用いて、マウス TSLP R - FLAG ポリペプチドを、TSLP R ポリペプチドのコード領域を含むフラグメントを増幅する PCR によって得た。次いで、この PCR 産物を pCR3.1 (Invitrogen) にサブクローニングし、得られたクローンを、配列決定によって分析した。細胞溶解物を抗 FLAG モノクローナル M2 抗体で免疫沈降したこと

10

20

30

40

50

を除いて、アフィニティー標識アッセイを本明細書中に記載のように行った。図8Bに示されるように、TSLPR免疫沈降後に、架橋したTSLPRバンドが観察され(レーン1)、これは、TSLPがTSLPR単独に弱く結合することを示す。

【0284】

マウスIL-7が、TSLPRポリペプチドおよびIL-7Rを発現する細胞において、TSLP結合について競合し得るか否かを試験するために、競合アッセイを行った。細胞溶解物を、漸増量の非標識マウスIL-7が¹²⁵I-TSLPとともに添加されることを除いて、本明細書中に記載のよう分析した。図8Cに示されるように、過剰なマウスIL-7は、IL-7R/TSLPRポリペプチドヘテロダイマーへのTSLPの結合を阻害した。アフィニティー標識アッセイは、TSLPの結合に関して、IL-7RおよびマウスTSLPRポリペプチドの共同性を示した。これらのアッセイはまた、IL-7がTSLPの結合について競合することを確立し、このことは、インビボでこれらの2つのサイトカインの間での潜在的な競合について暗示する。

10

【0285】

マウスIL-7RおよびマウスTSLPRポリペプチド、またはマウスIL-7R単独でトランスフェクトした293細胞へのTSLPの結合を、置換結合アッセイ(displacement binding assay)において分析した。2回洗浄した後、 1×10^6 のトランスフェクト293細胞を、一定量の¹²⁵I-標識TSLP(約20,000cpm)および種々の量の非標識TSLP中でインキュベートした。3時間のインキュベーション後、処置した細胞をオリーブ油およびN-ブチルフタレート中で遠心分離することにより培地から分離した。細胞に結合した放射活性をカウンターを用いて測定した。

20

【0286】

図9Aに示されるように、¹²⁵I-TSLPの非特異的結合は、マウスIL-7R単独(またはベクター単独)でトランスフェクトされた細胞で観察されたが、¹²⁵I-TSLPの特異的結合は、非標識TSLPが、¹²⁵I-TSLPの結合について競合することを除いて、IL-7RおよびTSLPRポリペプチドの両方でトランスフェクトされた細胞で観察された。TSLPRポリペプチド単独でトランスフェクトされた細胞は、非常に低い結合を示した。スキッチャード変換により結合データの分析を、LIGANDコンピュータープログラム(Munson and Rodbard, 1980, Anal. Biochem. 107: 220-39)を用いて行った。TSLPRポリペプチドおよびIL-7Rを発現する細胞へのTSLPの結合についての K_d は、約13nMであると決定された(図9B)。7回の独立した実験において、 K_d は、1.2~40nMの範囲であることが見出された。TSLPRポリペプチド単独を発現する細胞についてのTSLPの結合活性が非常に低いことに起因して、これらの細胞についての K_d を決定することはできなかった。また、置換結合アッセイを、NAG8/7細胞(これは、TSLPに応答して、TSLPレセプターを構成的に発現し、増殖する)を用いて行った(Friend et al., 前出; Levin et al., 前出)。これらの置換結合アッセイにおいて、 5×10^6 のNAG8/7細胞を、一定量の¹²⁵I標識TSLP(約180,000cpm)および種々の量の標識TSLP中でインキュベートした。このアッセイの残りを本明細書中に記載のように行った。図9Cに示されるように、NAG8/7細胞を用いて得た結合データのスキッチャード変換により、細胞が、約2.2nMの K_d を有する単一のクラスのレセプターを発現した(トランスフェクトした293細胞を用いて得た結果と類似する結果)ことを示唆した。

30

40

【0287】

また、置換結合アッセイを行って、TSLPRポリペプチドおよびIL-7Rでトランスフェクトした293細胞においてIL-7または非標識TSLPによる¹²⁵I標識TSLPの置換を比較した。図9Dは、マウスIL-7がTSLPRポリペプチドに対する結合について競合することを示す。

【0288】

50

IL-7またはTSLPのいずれかでのNAG8/7細胞の処置が、STAT5を活性化することが以前示された(Friend et al., 前出; Levin et al., 前出)。STAT5活性化におけるTSLPRポリペプチドのあり得る役割を、HepG2細胞を用いてCATアッセイにおいて分析した。IL-7R およびTSLPR、またはIL-7R および γ についての発現構築物を、リン酸カルシウム法により、pHRRR-CATベクターとともにHepG2細胞に導入した。pHRRR-CATベクターは、27bpのサイトカイン誘導性造血素レセプター応答エレメントの8つのタンデムコピーおよびSTAT5bを含む(Ziegler et al., 1995, Eur. J. Immunol. 25: 399-404)。トランスフェクトした細胞を一晩で回収し、その後、この細胞をトリプシン処理し、6ウェル培養ディッシュ中にプレートした。細胞を24時間のインキュベーションの間にプレートに接着させ、次いで、この細胞を、100ng/mlのIL-7またはTSLPいずれかを含む無血清培地中で、さらに24時間インキュベートした。

【0289】

CAT活性およびトランスフェクション効率について正規化した後の折りたたみ刺激を図10に示す。IL-7R 単独の存在下でのTSLP刺激(レーン2)またはIL-7R および γ でのTSLP刺激(レーン7)後に、CAT活性の増加は認められなかった。しかし、TSLPRポリペプチドが同時トランスフェクトされる場合、TSLP刺激後にCAT活性の劇的な増加が観察された(レーン5)。このことは、TSLPRポリペプチドの存在がTSLPシグナル伝達に必要であることを示す。 γ およびIL-7R での同時トランスフェクションが、TSLP依存性レポーター活性においてなんら効果を有さない場合、この組み合わせは、IL-7依存性レポーター活性を効率的に媒介した(レーン9)。

【0290】

多くのサイトカインレセプター鎖が、1つを超えるサイトカインにより共有されている。最も知られた例は、gp130(gp130は、IL-6、IL-11、シリア繊毛神経栄養因子、白血病阻害因子、オノスタチンM、およびカルジオトロフィン-1により共有されている(Hirano et al., 1997, Cytokine Growth Factor Rev. 8: 241-52; Taga and Kishimoto, 1997, Annu. Rev. Immunol. 15: 797-819)、 γ c(cは、IL-3、IL-5、およびGM-CSFにより共有されている(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))、および β (β は、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、およびIL-15により共有されている(Noguchi et al., 1993, Science 262: 1877-80; Kondo et al., 1994, 前出; Kondo et al., 1993, supra; Russell et al., 1994, supra; Takeshita et al., supra; Russell et al., 1993, 前出; Giri et al., 前出; Kimura et al., 前出))である。1つを超えるサイトカインレセプターの成分として働くサイトカインレセプター鎖を列挙すると、IL-2R (これは、IL-2レセプターおよびIL-15レセプター両方についての成分である)、およびIL-4R (これは、IL-4レセプターおよびIL-13レセプター両方についての成分である)が挙げられる。サイトカインレセプターサブユニットIL-7R は、本明細書中に示されたデータが、このサブユニットがIL-7レセプターおよびTSLPレセプター両方の成分であることを示すので、この列挙に加えられ得る。

【0291】

IL-7 γ マウスにおけるT細胞およびB細胞発生における欠損の観察(von Freeden-Jeffrey et al., 1995, J. Exp. Med. 181: 50

1519-26)は、TSLPがIL-7の喪失について十分に補償できないことを示唆する。TSLPシグナル伝達におけるIL-7Rの機能的共同の試験は、I17⁺マウスおよびI17⁻マウスにおけるB細胞の差異を説明するために役立つ(Candéias et al., 1997, *Immunity* 6:501-08; von Freeden-Jeffrey et al., 前出; Peschon et al., 1994, *J. Exp. Med.* 180:1955-60; He et al., 1997, *J. Immunol.* 158:2592-99)。TSLPRポリペプチドのさらなる特徴づけは、本発明を補助する。

【0292】

(実施例5: TSLPRポリペプチドの生成)

(A. 細菌におけるTSLPRポリペプチドの発現)

PCRを用いて、TSLPRポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列を増幅する。このPCRには、この配列の5'および3'末端に対応するプライマーを用いる。増幅したDNA産物を改変して、発現ベクター内への挿入を可能にするために制限酵素部位を含むようにし得る。PCR産物をゲル精製し、そして標準的組み換えDNA方法論を用いて発現ベクター中に挿入する。luxプロモーターおよびカナマイシン耐性をコードする遺伝子を含むpAMG21(ATCC番号98113)のような代表的ベクターを、挿入したDNAの方向性クローニングのために、BamHIおよびNdeIを用いて消化する。連結した混合物を、エレクトロポレーションによってE. coli宿主株中に形質転換し、そして形質転換体をカナマイシン耐性について選択する。選択したコロニー由来のプラスミドDNAを、単離し、そしてDNA配列決定に供してインサート(挿入物)の存在を確認する。

【0293】

形質転換した宿主細胞を、導入前に、30 μg/mLカナマイシンを含有する2×YT培地中で30分でインキュベートする。最終濃度30 ng/mLへのN-(3-オキソヘキサノイル)-DL-ホモセリンラクトンの添加、それに続く30分または37分での6時間のインキュベーションによって、遺伝子発現を誘導する。TSLPRポリペプチドの発現を、培養物の遠心分離、細菌ペレットの再懸濁および溶解、ならびに、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動による宿主細胞タンパク質の分析によって評価する。

【0294】

TSLPRポリペプチドを含有する封入体を、以下の通り精製する。細菌細胞を遠心分離によってペレット化し、そして水中に再懸濁する。この細胞懸濁液を超音波処理によって溶解し、そして195,000×gでの5~10分間の遠心分離によってペレット化する。この上清を廃棄し、そしてペレットを洗浄してホモジナイザーに移す。このペレットを、均一に懸濁されるまで、5 mLのPercol1溶液(75%液体Percol1および0.15 M NaCl)中にホモジナイズし、次いで希釈して21,600×gで30分間遠心分離する。封入体を含む勾配画分を回収してプールする。単離した封入体をSDS-PAGEによって分析する。

【0295】

E. coliが産生したTSLPRポリペプチドに相当する、SDSポリアクリルアミドゲル上の単一のバンドを、ゲルから切り出し、そしてN末端アミノ酸配列を、本質的にMatsuda et al., 1987, *J. Biol. Chem.* 262:10~35に記載のように決定する。

【0296】

(B. 哺乳動物細胞におけるTSLPRポリペプチドの発現)

PCRを用いて、TSLPRポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列を増幅する。このPCRには、この配列の5'および3'末端に対応するプライマーを用いる。増幅したDNA産物を改変して、発現ベクター内への挿入を可能にするために制限酵素部位を含むようにし得る。PCR産物をゲル精製し、そして標準的組み換えDNA方法論を用いて発現ベクター中に挿入する。エプスタイン-バーウイルス複製起点を含む代表的な発

10

20

30

40

50

現ベクターである pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を、293-EbNA-1 細胞における TSLPR ポリペプチドの発現のために用い得る。増幅およびゲル精製した PCR 産物を、pCEP4 ベクターに連結し、そしてリポフェクチンによって 293-EbNA 細胞中に導入する。トランスフェクトした細胞を、100 µg/mL のハイグロマイシン中で選択し、そして得られた薬物耐性培養物をコンフルエンスになるまで増殖する。次いで、この細胞を無血清培地中で 72 時間培養する。馴化培地を取り出し、TSLPR ポリペプチド発現を SDS-PAGE によって分析する。

【0297】

TSLPR ポリペプチド発現は、銀染色によって検出できる。あるいは、TSLPR ポリペプチドを、ペプチドタグに対する抗体を用いてウエスタンブロット分析によって検出可能であり得る、エピトープタグ (例えば、IgG 定常ドメインまたは FLAG エピトープ) を有する融合タンパク質として生成する。

10

【0298】

TSLPR ポリペプチドを、SDS-ポリアクリルアミドゲルから切り出し得るか、または TSLPR 融合タンパク質を、エピトープタグに対するアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、そして本明細書に記載のような N 末端アミノ酸配列分析に供する。

【0299】

(C. 哺乳動物細胞における TSLPR ポリペプチドの発現および精製)
リポフェクチンまたはリン酸カルシウムプロトコールのいずれかを用いて、293 EbNA 細胞または CHO 細胞中に、TSLPR ポリペプチド発現構築物を導入する。

20

【0300】

生成される TSLPR ポリペプチドに対する機能的研究を行うため、ハイグロマイシン選択 293 EbNA クローニングのプールから大量の馴化培地を生成する。この細胞を 500 cm Nunc Triple Flasks 中で、80% コンフルエンスになるまで培養し、その後、培地を回収する 1 週間前に無血清培地に切り換える。馴化培地を回収し、そして精製まで -20 °C に凍結する。

【0301】

馴化培地を下記のとおり、アフィニティークロマトグラフィーによって精製する。この培地を解凍し、次いで 0.2 µm フィルターに通す。プロテイン G カラムを PBS で pH 7.0 に平衡化し、次いで濾過した培地をロードする。このカラムを A₂₈₀ の吸収がベースラインに達するまで PBS で洗浄する。0.1 M Glycine-HCl を用いて pH 2.7 で TSLPR ポリペプチドを、カラムから溶出し、直ちに 1 M Tris-HCl を用いて pH 8.5 で中和する。TSLPR ポリペプチドを含有する画分をプールし、PBS 中で透析し、そして -70 °C で貯蔵した。

30

【0302】

ヒト TSLPR ポリペプチド-Fc 融合ポリペプチドの第 Xa 因子切断について、アフィニティークロマトグラフィー精製したタンパク質を、50 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、2 mM CaCl₂ 中で pH 8.0 で透析する。制限プロテアーゼ第 Xa 因子を、透析したタンパク質に 1/100 (w/w) で添加し、そしてこのサンプルを室温で一晩消化する。

40

【0303】

(実施例 6: 抗 TSLPR ポリペプチド抗体の生成)
TSLPR ポリペプチドに対する抗体を、生物学的合成または化学的合成によって生成した、精製タンパク質または TSLPR ペプチドを用いて免疫することによって獲得し得る。抗体を生成するための適切な手順は、Hudson および Bay、Practical Immunology (第二版、Blackwell Scientific Publication) に記載の手順を含む。

【0304】

抗体生成のための 1 つの手順において、動物 (代表的には、マウスまたはウサギ) に、TSLPR 抗原 (例えば、TSLPR ポリペプチド) を注射し、そして、ハイブリドーマ産

50

生のため、E L I S Aによって決定した十分な血清力価レベルを有する動物を、選択する。免疫した動物の脾臓を回収し、そして単一細胞懸濁液として調製し、これから脾臓細胞を回収する。脾臓細胞をマウスミエローム細胞（例えば、S p 2 / 0 - A g 1 4細胞）に融合し、D M E M（2 0 0 U / m Lペニシリン、2 0 0 μ g / m L硫酸ストレプトマイシン、および4 m Mグルタミン含有）中でまずインキュベートし、次いで、H A T選択培地（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン）中でインキュベートする。選択後、組織培養上清を各融合ウェルから取り出し、そしてE L I S Aによって、抗T S L P R抗体産生について試験する。

【0305】

抗T S L P R抗体を得るため、別の手順をまた、使用し得る。この手順は例えば、ヒト抗体の生成のためのヒトI g遺伝子座を保有するトランスジェニックマウスの免疫、および合成抗体ライブラリー（例えば、抗体可変ドメインの変異誘発によって生成されるライブラリーなど）のスクリーニングである。

10

【0306】

（実施例7：トランスジェニックマウスにおけるT S L P Rポリペプチドの発現）
T S L P Rポリペプチドの生物学的活性を評価するため、肝臓特異的A p o Eプロモーターの制御下で、T S L P Rポリペプチド/F c融合タンパク質をコードする構築物を調製する。この構築物の送達により、T S L P Rポリペプチドの機能に関して情報を与える、病理的变化を生じることが期待される。同様に、アクチンプロモーターの制御下で、全長T S L P Rポリペプチドを含む構築物を調製する。この構築物の送達により、遍在性発現を生じることが期待される。

20

【0307】

これらの構築物を生成するために、P C Rを用いて、T S L P RポリペプチドをコードするテンプレートD N A配列を増幅する。このP C Rには、所望の配列の5'および3'末端に対応するプライマーを用いる。そしてこのプライマーは、発現ベクター内への増幅産物の挿入を可能にするために制限酵素部位を組み込む。増幅後、P C R産物をゲル精製し、適切な制限酵素で消化し、そして標準的組み換えD N A技術を用いて発現ベクター中に連結する。例えば、増幅したT S L P Rポリペプチド配列を、G r a h a mら、1 9 9 7、N a t u r e G e n e t i c s , 1 7 : 2 7 2 ~ 7 4 およびR a yら、1 9 9 1 , G e n e s D e v . 5 : 2 2 6 5 ~ 7 3に記載のように、ヒトアクチンプロモーターの制御下で発現ベクター中にクローニングし得る。

30

【0308】

連結（ライゲーション）後、反応混合物を用いて、E . c o l i宿主株をエレクトロポレーションによって形質転換し、そして形質転換体を、薬物耐性について選択する。選択したコロニー由来のプラスミドD N Aを単離して、D N A配列決定に供し、適切なインサートが存在することおよび変異が存在しないことを確認する。T S L P Rポリペプチド発現ベクターを、2回のC s C l密度勾配遠心分離を通じて精製し、適切な制限酵素で切断し、そして、T S L P Rポリペプチド導入遺伝子を含有する直鎖化フラグメントを、ゲル電気泳動によって精製する。精製したフラグメントを、5 m M T r i s（p H 7 . 4）および0 . 2 m M E D T A中で、2 m g / m Lの濃度で、再懸濁する。

40

【0309】

B D F 1 × B D F 1交配マウス由来の単一細胞胚に、記載（P C T公開番号W O 9 7 / 2 3 6 1 4）のように注射する。胚を、C O₂インキュベーター中で一晚培養し、そして1 5 ~ 2 0の2細胞胚を偽妊娠C D 1雌性マウスの卵管に移す。マイクロインジェクションした胚の移植から得た子孫を、以下のように、ゲノムD N Aサンプル中に組み込まれた導入遺伝子のP C R増幅によってスクリーニングする。耳切片を2 0 m Lの耳緩衝液（2 0 m M T r i s、p H 8 . 0、1 0 m M E D T A、0 . 5 % S D S、および5 0 0 m g / m L プロテイナーゼK）中で、5 5 °Cで一晩消化する。次いで、このサンプルを2 0 0 m LのT Eで希釈し、そして2 m Lの耳サンプルを、適切なプライマーを用いるP C R反応中で用いる。

50

【0310】

8週齢で、トランスジェニック創始動物およびコントロール動物を、剖検および病理分析のため、屠殺する。脾臓の一部を取り出し、そしてTotal RNA Extraction Kit (Qiagen)を用いて、脾臓から、総細胞RNAを単離し、そして導入遺伝子発現を、RT-PCRによって決定する。脾臓から回収したRNAを、以下のよう
 に、SuperScriptTM Preamplification System (Gibco-BRL)を用いてcDNAに変換する。適切なプライマー(発現ベクター配列中に位置し、そしてTSLPRポリペプチド導入遺伝子の3'側にある)を用いて、
 導入遺伝子転写物からcDNA合成をプライムする。トランスジェニック創始動物および
 コントロール由来の10mgの総脾臓RNAを、1mMのプライマーとともに、10分間
 70 でインキュベートし、そして氷上に置く。次いで、反応物に、10mM Tris-
 HCl、pH 8.3、50mM KCl、2.5mM MgCl₂、10mMの各dNTP、0.1mM DTT、および200UのSuperScript II逆転写酵素
 を補充する。42 で50分間のインキュベーション後、72 で15分間加熱すること
 によって反応を停止し、2UのRNase Hを用いて20分間37 で消化する。次いで、
 サンプルをTSLPRポリペプチドに特異的なプライマーを用いるPCRによって増
 幅する。

【0311】

Tslp^{-/-}またはTslpr^{-/-}マウスの表現型を決定することはまた、TSLPの正確な役割を規定することを補助する。

【0312】

(実施例8:トランスジェニックマウスにおけるTSLPRポリペプチドの生物学的活性)

安楽死の前に、トランスジェニック動物を計量し、イソフルラン(isoflurane)によって麻酔し、そして心臓穿刺によって採血する。サンプルを、血液学および血清化学分析に供する。X線撮影を、最終的な放血後に行う。肉眼での解剖の際に、主な内臓器官を、重量分析に供する。

【0313】

肉眼での解剖後、組織(すなわち、肝臓、脾臓、膵臓、胃、胃腸管全体、腎臓、生殖器官、皮膚および乳腺、骨、脳、心臓、肺、胸腺、気管、食道、甲状腺、副腎、膀胱、リンパ節および骨格筋)を取出し、そして10%緩衝化Zn-ホルマリン中で組織学的検査のために固定する。固定後、組織をパラフィンブロック中で処理し、そして3mmの切片を得る。全ての切片を、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、次いで組織学的分析に供する。

【0314】

トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスの両方の脾臓、リンパ節およびパイアー斑を、以下の通りにB細胞特異的抗体およびT細胞特異的抗体についての免疫組織学的分析に供する。ホルマリンで固定したパラフィン包埋切片を脱パラフィン処理し、そして脱イオン水中で水和する。切片を3%過酸化水素でクエンチし、Protein Block (Lipshaw, Pittsburgh, PA)でブロックし、そしてラットモノクローナル抗マウスB220およびCD3 (Harlan, Indianapolis, IN)中でインキュベートする。抗体結合を、色素原(chromagen)としてDAB (BioTek, Santa Barbara, CA)を用いて、ビオチン化ウサギ抗ラット免疫グロブリンおよびペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジン(BioGenex, San Ramon, CA)によって検出する。切片を、ヘマトキシリンで対比染色する。

【0315】

剖検後、トランスジェニック動物およびコントロールの同腹仔由来の脾臓および胸腺のMLNおよび切片を取出す。シリンジの平らな末端を用いて100mmナイロン性細胞ストレーナー(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)

の底に対してこの組織を穏やかに粉砕することによって単細胞懸濁物を調製する。細胞を2回洗浄し、計数し、次いで各組織由来の約 1×10^6 細胞を、20 μ L 容量において 0.5 μ g CD16/32 (Fc III/II) Fc ブロックで10分間インキュベートする。次いで、サンプルを、FITC または PE に結合体化した、CD90.2 (Thy-1.2)、CD45R (B220)、CD11b (Mac-1)、Gr-1、CD4 または CD8 に対するモノクローナル抗体 (PharMingen, San Diego, CA) の 0.5 μ g 抗体を有する、100 μ L 容量の PBS (Ca⁺ および Mg⁺ を欠く)、0.1% ウシ血清アルブミン および 0.01% アジ化ナトリウム 中で 2~8 で 30 分間染色する。抗体結合後、細胞を洗浄し、次いで FACSscan (Becton Dickinson) でのフローサイトメトリーによって分析する。

10

【0316】

本発明を好ましい実施形態に関して記載してきたが、バリエーションおよび改変が当業者に思い浮かぶことが理解される。それゆえ、添付の特許請求の範囲が、本願発明の範囲内に入る全てのこのような均等なバリエーションを包含することが意図される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1A~1Bは、マウス TSLPR 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号1)、およびマウス TSLPR ポリペプチドの推定アミノ酸配列 (配列番号2) を示す。推定シグナルペプチド (下線部) および膜貫通ドメイン (二重下線部) を示す。

【図2】

図2は、マウス TSLPR ポリペプチド (上の配列; 配列番号2) とマウス共通サイトカインレセプター鎖 (c) (下の配列; 配列番号12) とのアミノ酸配列アライメントを示す。同一の残基 (囲み)、潜在的な N 結合グリコシル化部位 (*), ならびに推定シグナルペプチドおよび膜貫通ドメイン (下線部) を示す。

20

【図3】

図3A~3Bは、ヒト TSLPR 遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号4)、およびヒト TSLPR ポリペプチドの推定アミノ酸配列 (配列番号5) を示す。推定シグナルペプチド (下線部) および膜貫通ドメイン (二重下線部) を示す。

【図4】

図4~4Bは、ヒト TSLPR / FLAG のヌクレオチド配列 (配列番号7) およびヒト TSLPR / FLAG ポリペプチドの推定アミノ酸配列 (配列番号8) を示す。FLAG ペプチド (点線部)、推定シグナルペプチド (下線部)、および推定膜貫通ドメイン (二重下線部) を示す。

30

【図5】

図5は、マウス TSLPR ポリペプチド (上の配列; 配列番号2) およびヒト TSLPR ポリペプチド (下の配列; 配列番号5) のアミノ酸配列アライメントを示す。

【図6】

図6A~6Cは、(A) マウス TSLPR ポリペプチドのインビトロ翻訳、(B) NAG 8/7 細胞由来のマウス TSLPR ポリペプチドの免疫沈降、および (C) マウス TSLPR mRNA 発現のノーザンブロット分析を示す。

40

【図7】

図7は、c-Kit / c、c-Kit / TSLPR および c-Kit / 、または c-Kit / c および c-Kit / についてのキメラ発現構築物でトランスフェクトした細胞を使用する増殖アッセイにおいて得られた結果を示す。

【図8】

図8A~8Cは、¹2⁵I-TSLP が、マウス IL-7R、マウス TSLPR、マウス IL-7R およびマウス TSLPR、またはヒト IL-7R およびマウス TSLPR についての発現構築物でトランスフェクトした 293 細胞に添加され、次いで DSS と架橋する、親和性標識アッセイにおいて得られた結果を示す。

【図9】

50

図 9 A ~ 9 D は、置換結合アッセイにおいて得られた結果を示す。

【 図 1 0 】

図 1 0 は、H e p G 2 細胞が、I L - 7 R および T S L P R、または γ および p H R R E - C A T についての発現構築物で同時トランスフェクトされる、C A T アッセイにおいて得られた結果を示す。

【 図 6 】

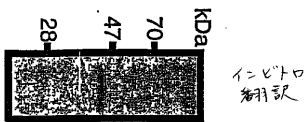


FIG. 6A

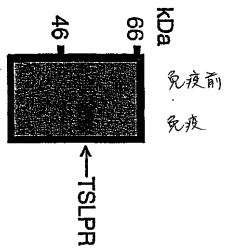


FIG. 6B

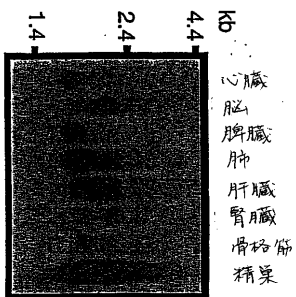
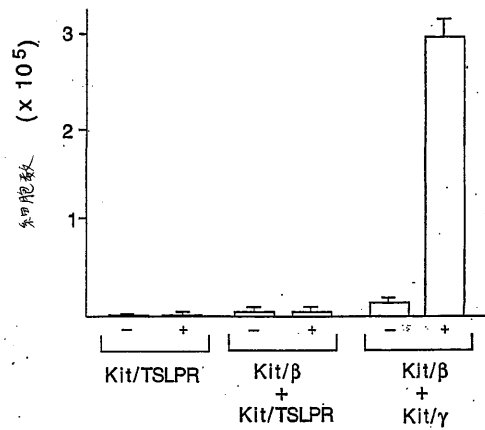


FIG. 6C

【 図 7 】

FIG. 7



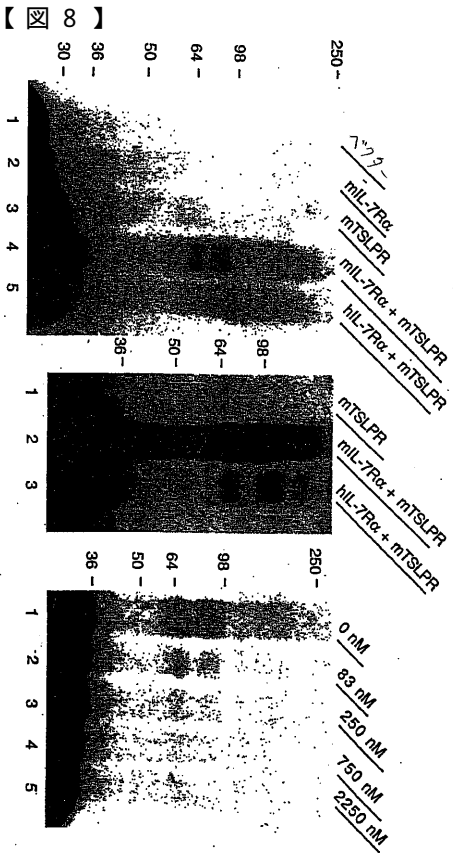


FIG. 8A

FIG. 8B

FIG. 8C

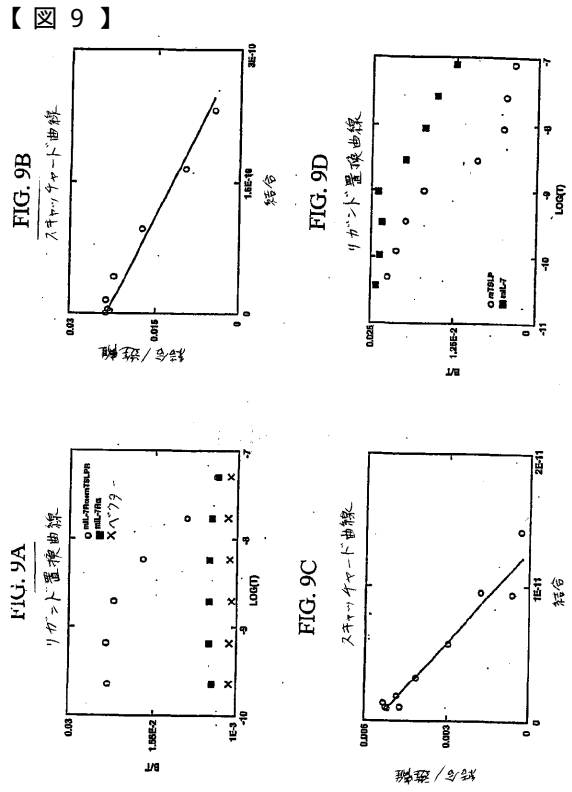


FIG. 9A

FIG. 9B

FIG. 9C

FIG. 9D

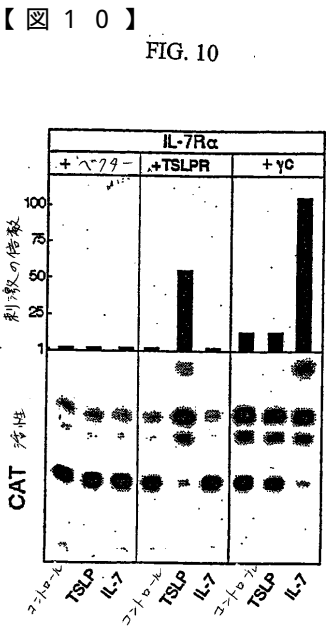


FIG. 10

FIG. 10

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/00724 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/705 (74) Agent: NOONAN, Kevin; McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff, 300 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/20820
- (22) International Filing Date: 28 June 2001 (28.06.2001) (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/214,866 28 June 2000 (28.06.2000) US (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 60/214,866 (CIP) Filed on 28 June 2000 (28.06.2000)
- (71) Applicant (for all designated States except US): AMGEN, INC. [US/US]; One Amgen Center Drive, Mailstop 27-A-A, Thousand Oaks, CA 91320 (US).
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): SARIS, Christiaan, M. [NL/US]; 4027 Colonnat Place, Newbury Park, CA 91320 (US). CHANG, Ming-Shi [US/TW]; 3rd Floor, No.58 Tong-Ning Road, Taiwan (TW).
- Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/00724 A2

(54) Title: THYMIC STROMAL LYMPHOPOIETIN RECEPTOR MOLECULES AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention provides Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor (TSLPR) polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention also provides selective binding agents, vectors, host cells, and methods for producing TSLPR polypeptides. The invention further provides pharmaceutical compositions and methods for the diagnosis, treatment, amelioration, and/or prevention of diseases, disorders, and conditions associated with TSLPR polypeptides.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

**THYMIC STROMAL LYMPHOPOIETIN RECEPTOR
MOLECULES AND USES THEREOF**

This application claims the benefit of priority from U.S. Provisional Patent
5 Application No. 60/214,866, filed on June 28, 2000, the disclosure of which is
explicitly incorporated by reference herein.

Field of the Invention

The present invention relates to Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor
10 (TSLPR) polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention
also relates to selective binding agents, vectors, host cells, and methods for producing
TSLPR polypeptides. The invention further relates to pharmaceutical compositions
and methods for the diagnosis, treatment, amelioration, and/or prevention of diseases,
disorders, and conditions associated with TSLPR polypeptides.

15

Background of the Invention

Technical advances in the identification, cloning, expression, and
manipulation of nucleic acid molecules and the deciphering of the human genome
have greatly accelerated the discovery of novel therapeutics. Rapid nucleic acid
20 sequencing techniques can now generate sequence information at unprecedented rates
and, coupled with computational analyses, allow the assembly of overlapping
sequences into partial and entire genomes and the identification of polypeptide-
encoding regions. A comparison of a predicted amino acid sequence against a
database compilation of known amino acid sequences allows one to determine the
25 extent of homology to previously identified sequences and/or structural landmarks.
The cloning and expression of a polypeptide-encoding region of a nucleic acid
molecule provides a polypeptide product for structural and functional analyses. The
manipulation of nucleic acid molecules and encoded polypeptides may confer
advantageous properties on a product for use as a therapeutic.

30

In spite of the significant technical advances in genome research over the past
decade, the potential for the development of novel therapeutics based on the human
genome is still largely unrealized. Many genes encoding potentially beneficial
polypeptide therapeutics or those encoding polypeptides, which may act as "targets"
for therapeutic molecules, have still not been identified. Accordingly, it is an

WO 02/00724

PCT/US01/20820

object of the invention to identify novel polypeptides, and nucleic acid molecules encoding the same, which have diagnostic or therapeutic benefit.

Cytokines regulate a variety of cellular responses including proliferation, differentiation, and survival. Among the different classes of cytokines are the type I cytokines, which form four α -helical bundle structures that exhibit an up-up-down-down topology (Bazan, 1990, *Immunol. Today* 11:350-54; Leonard and O'Shea, 1998, *Annu. Rev. Immunol.* 16:293-322; Leonard, *Fundamental Immunology* 741-74 (Paul, ed., Lippincott Raven Publishers 4 ed., 1999)). Type I cytokines include many interleukins, such as IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, and IL-15 as well as other hematologically-active molecules such as GM-CSF, erythropoietin, thrombopoietin, and molecules such as growth hormone and prolactin. Signaling by type I cytokines involves interaction with homodimers, heterodimers, or higher order receptor oligomers of the type I cytokine receptor superfamily. Ligand binding induces dimerization or higher order oligomerization, resulting in downstream signaling, in part involving the Jak-STAT pathway (Bazan, *supra*; Leonard and O'Shea, *supra*; Leonard, *supra*).

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is a cytokine whose biological activities overlap with those of IL-7. For example, both TSLP and IL-7 induce tyrosine phosphorylation of the transcription factor Stat5 (Isaksen *et al.*, 1999, *J. Immunol.* 163:5971-77). TSLP activity was originally identified in the conditioned medium of a thymic stromal cell line that supported the development of murine IgM⁺ B-cells from fetal liver hematopoietic progenitor cells (Friend *et al.*, 1994 *Exp. Hematol.* 22:321-28). Moreover, TSLP can promote B-cell lymphopoiesis in long-term bone marrow cultures and can co-stimulate both thymocytes and mature T-cells (Friend *et al.*, *supra*; Levin *et al.*, 1999, *J. Immunol.* 162:677-83). TSLP may also serve as an extrinsic signal to specifically rearrange the T-cell receptor gamma locus (Candeias *et al.*, 1997, *Immunol. Lett.* 57:9-14). Thus, the isolation and characterization of the cytokine receptor for TSLP would allow for the identification of compounds useful in treating TSLP-related diseases or conditions, such as those affecting B-cell development, T-cell development, T-cell receptor gene rearrangement, or regulation of the Stat5 transcription factor.

Summary of the Invention

WO 02/00724

PCT/US01/20820

The present invention relates to novel TSLPR nucleic acid molecules and encoded polypeptides.

The invention provides for an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

- 5 (a) the nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, or SEQ ID NO: 11;
- (b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8;
- 10 (c) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of either (b) or (c); and
- (d) a nucleotide sequence complementary to either (b) or (c).

The invention also provides for an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

- 15 (a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide which is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8;
- (b) a nucleotide sequence encoding an allelic variant or splice variant of
- 20 the nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, or SEQ ID NO: 11, or (a);
- (c) a region of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, or SEQ ID NO: 11, (a), or (b) encoding a polypeptide fragment of at least about 25 amino acid residues, wherein
- 25 the polypeptide fragment has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8, or is antigenic;
- (d) a region of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, or SEQ ID NO: 11, or any of (a)- (c) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;
- 30 (e) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a) - (d); and
- (f) a nucleotide sequence complementary to any of (a) - (d).

WO 02/00724

PCT/US01/20820

The invention further provides for an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

- (a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8;
- (b) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 with at least one amino acid insertion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8;
- (c) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 with at least one amino acid deletion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8;
- (d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8;
- (e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8;
- (f) a nucleotide sequence of any of (a) - (e) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;
- (g) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a) - (f); and
- (h) a nucleotide sequence complementary to any of (a) - (e).

The present invention provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

The invention also provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

- (a) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, or SEQ ID NO: 9, optionally further comprising an amino-terminal methionine;
- (b) an amino acid sequence for an ortholog of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8;
- (c) an amino acid sequence which is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8;
- (d) a fragment of the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the fragment has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8, or is antigenic; and
- (e) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8, or any of (a) - (c).

The invention further provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

- (a) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8;
- (b) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 with at least one amino acid insertion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8;
- (c) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8;

WO 02/00724

PCT/US01/20820

- (d) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8; and
- 5 (e) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ
- 10 ID NO: 8.

Also provided are fusion polypeptides comprising TSLPR amino acid sequences.

- The present invention also provides for an expression vector comprising the
- 15 isolated nucleic acid molecules as set forth herein, recombinant host cells comprising the recombinant nucleic acid molecules as set forth herein, and a method of producing a TSLPR polypeptide comprising culturing the host cells and optionally isolating the polypeptide so produced.

- A transgenic non-human animal comprising a nucleic acid molecule encoding
- 20 a TSLPR polypeptide is also encompassed by the invention. The TSLPR nucleic acid molecules are introduced into the animal in a manner that allows expression and increased levels of a TSLPR polypeptide, which may include increased circulating levels. Alternatively, the TSLPR nucleic acid molecules are introduced into the animal in a manner that prevents expression of endogenous TSLPR polypeptide (*i.e.*,
- 25 generates a transgenic animal possessing a TSLPR polypeptide gene knockout). The transgenic non-human animal is preferably a mammal, and more preferably a rodent, such as a rat or a mouse.

Also provided are derivatives of the TSLPR polypeptides of the present invention.

- 30 Additionally provided are selective binding agents such as antibodies and peptides capable of specifically binding the TSLPR polypeptides of the invention. Such antibodies and peptides may be agonistic or antagonistic.

Pharmaceutical compositions comprising the nucleotides, polypeptides, or selective binding agents of the invention and one or more pharmaceutically

WO 02/00724

PCT/US01/20820

acceptable formulation agents are also encompassed by the invention. The pharmaceutical compositions are used to provide therapeutically effective amounts of the nucleotides or polypeptides of the present invention. The invention is also directed to methods of using the polypeptides, nucleic acid molecules, and selective binding agents.

The TSLPR polypeptides and nucleic acid molecules of the present invention may be used to treat, prevent, ameliorate, and/or detect diseases and disorders, including those recited herein.

The present invention also provides a method of assaying test molecules to identify a test molecule that binds to a TSLPR polypeptide. The method comprises contacting a TSLPR polypeptide with a test molecule to determine the extent of binding of the test molecule to the polypeptide. The method further comprises determining whether such test molecules are agonists or antagonists of a TSLPR polypeptide. The present invention further provides a method of testing the impact of molecules on the expression of TSLPR polypeptide or on the activity of TSLPR polypeptide.

Methods of regulating expression and modulating (*i.e.*, increasing or decreasing) levels of a TSLPR polypeptide are also encompassed by the invention. One method comprises administering to an animal a nucleic acid molecule encoding a TSLPR polypeptide. In another method, a nucleic acid molecule comprising elements that regulate or modulate the expression of a TSLPR polypeptide may be administered. Examples of these methods include gene therapy, cell therapy, and anti-sense therapy as further described herein.

25 Brief Description of the Figures

Figures 1A-1B illustrate the nucleotide sequence of the murine TSLPR gene (SEQ ID NO: 1) and deduced amino acid sequence of murine TSLPR polypeptide (SEQ ID NO: 2). The predicted signal peptide (underline) and transmembrane domain (double underline) are indicated;

30 Figure 2 illustrates an amino acid sequence alignment of murine TSLPR polypeptide (upper sequence; SEQ ID NO: 2) and murine common cytokine receptor γ chain (γ_c) (lower sequence; SEQ ID NO: 12). Identical residues (boxed), potential Nlinked

WO 02/00724

PCT/US01/20820

glycosylation sites (*), and predicted signal peptide and transmembrane domain (underline) are indicated;

5 Figures 3A-3B illustrate the nucleotide sequence of the human TSLPR gene (SEQ ID NO: 4) and the deduced amino acid sequence of human TSLPR polypeptide (SEQ ID NO: 5). The predicted signal peptide (underline) and transmembrane domain (double underline) are indicated;

10 Figures 4A-4B illustrate the nucleotide sequence of human TSLPR/FLAG (SEQ ID NO: 7) and the deduced amino acid sequence of human TSLPR/FLAG polypeptide (SEQ ID NO: 8). The FLAG peptide (dotted underline), predicted signal peptide (underline), and predicted transmembrane domain (double underline) are indicated;

15 Figure 5 illustrates an amino acid sequence alignment of murine TSLPR polypeptide (upper sequence; SEQ ID NO: 2) and human TSLPR polypeptide (lower sequence; SEQ ID NO: 5);

20 Figures 6A-6C illustrate (A) *in vitro* translation of murine TSLPR polypeptide, (B) immunoprecipitation of murine TSLPR polypeptide from NAG 8/7 cells, and (C) northern blot analysis of murine TSLPR mRNA expression.

25 Figure 7 illustrates the results obtained in proliferation assays using cells transfected with chimeric expression constructs for c-Kit/ γ_c , c-Kit/TSLPR and c-Kit/ β , or c-Kit/ γ_c and c-Kit/ β .

30 Figures 8A-8C illustrate the results obtained in affinity labeling assays in which ^{125}I -TSLP was added to 293 cells transfected with expression constructs for murine IL-7R α , murine TSLPR, murine IL-7R α and murine TSLPR, or human IL-7R α and murine TSLPR, and then cross-linked with DSS.

Figures 9A-9D illustrate the results obtained in displacement binding assays.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

Figure 10 illustrates the results obtained in CAT assays in which HepG2 cells were co-transfected with expression constructs for IL-7R α and TSLPR, or γ_c , and pHRRE-CAT.

5 Detailed Description of the Invention

The section headings used herein are for organizational purposes only and are not to be construed as limiting the subject matter described. All references cited in this application are expressly incorporated by reference herein.

10 Definitions

The terms "TSLPR gene" or "TSLPR nucleic acid molecule" or "TSLPR polynucleotide" refer to a nucleic acid molecule comprising or consisting of a nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, or SEQ ID NO: 11, a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8, and nucleic acid molecules as defined herein.

The term "TSLPR polypeptide allelic variant" refers to one of several possible naturally occurring alternate forms of a gene occupying a given locus on a chromosome of an organism or a population of organisms.

20 The term "TSLPR polypeptide splice variant" refers to a nucleic acid molecule, usually RNA, which is generated by alternative processing of intron sequences in an RNA transcript of TSLPR polypeptide amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8.

The term "isolated nucleic acid molecule" refers to a nucleic acid molecule of 25 the invention that (1) has been separated from at least about 50 percent of proteins, lipids, carbohydrates, or other materials with which it is naturally found when total nucleic acid is isolated from the source cells, (2) is not linked to all or a portion of a polynucleotide to which the "isolated nucleic acid molecule" is linked in nature, (3) is operably linked to a polynucleotide which it is not linked to in nature, or (4) does not 30 occur in nature as part of a larger polynucleotide sequence. Preferably, the isolated nucleic acid molecule of the present invention is substantially free from any other contaminating nucleic acid molecule(s) or other contaminants that are found in its natural environment that would interfere with its use in polypeptide production or its

WO 02/00724

PCT/US01/20820

therapeutic, diagnostic, prophylactic or research use.

The term "nucleic acid sequence" or "nucleic acid molecule" refers to a DNA or RNA sequence. The term encompasses molecules formed from any of the known base analogs of DNA and RNA such as, but not limited to 4-acetylcytosine, 8-hydroxy-N⁶-methyladenosine, aziridinyl-cytosine, pseudoisocytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouracil, 5-carboxy-methylaminomethyluracil, dihydrouracil, inosine, N⁶-iso-pentenyladenine, 1-methyladenine, 1-methylpseudouracil, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethyl-guanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N⁶-methyladenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyamino-methyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarbonyl-methyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N⁶-isopentenyladenine, uracil-5-oxacetic acid methylester, uracil-5-oxacetic acid, oxybutosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, N-uracil-5-oxacetic acid methylester, uracil-5-oxacetic acid, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, and 2,6-diaminopurine.

The term "vector" is used to refer to any molecule (e.g., nucleic acid, plasmid, or virus) used to transfer coding information to a host cell.

The term "expression vector" refers to a vector that is suitable for transformation of a host cell and contains nucleic acid sequences that direct and/or control the expression of inserted heterologous nucleic acid sequences. Expression includes, but is not limited to, processes such as transcription, translation, and RNA splicing, if introns are present.

The term "operably linked" is used herein to refer to an arrangement of flanking sequences wherein the flanking sequences so described are configured or assembled so as to perform their usual function. Thus, a flanking sequence operably linked to a coding sequence may be capable of effecting the replication, transcription and/or translation of the coding sequence. For example, a coding sequence is operably linked to a promoter when the promoter is capable of directing transcription of that coding sequence. A flanking sequence need not be contiguous with the coding sequence, so long as it functions correctly. Thus, for example, intervening untranslated yet transcribed sequences can be present between a promoter sequence

WO 02/00724

PCT/US01/20820

and the coding sequence and the promoter sequence can still be considered "operably linked" to the coding sequence.

The term "host cell" is used to refer to a cell which has been transformed, or is capable of being transformed with a nucleic acid sequence and then of expressing a selected gene of interest. The term includes the progeny of the parent cell, whether or not the progeny is identical in morphology or in genetic make-up to the original parent, so long as the selected gene is present.

The term "TSLPR polypeptide" refers to a polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 and related polypeptides. Related polypeptides include TSLPR polypeptide fragments, TSLPR polypeptide orthologs, TSLPR polypeptide variants, and TSLPR polypeptide derivatives, which possess at least one activity of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8. TSLPR polypeptides may be mature polypeptides, as defined herein, and may or may not have an amino-terminal methionine residue, depending on the method by which they are prepared.

The term "TSLPR polypeptide fragment" refers to a polypeptide that comprises a truncation at the amino-terminus (with or without a leader sequence) and/or a truncation at the carboxyl-terminus of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8. The term "TSLPR polypeptide fragment" also refers to amino-terminal and/or carboxyl-terminal truncations of TSLPR polypeptide orthologs, TSLPR polypeptide derivatives, or TSLPR polypeptide variants, or to amino-terminal and/or carboxyl-terminal truncations of the polypeptides encoded by TSLPR polypeptide allelic variants or TSLPR polypeptide splice variants. TSLPR polypeptide fragments may result from alternative RNA splicing or from *in vivo* protease activity. Membrane-bound forms of a TSLPR polypeptide are also contemplated by the present invention. In preferred embodiments, truncations and/or deletions comprise about 10 amino acids, or about 20 amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or more than about 100 amino acids. The polypeptide fragments so produced will comprise about 25 contiguous amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or about 150 amino acids, or about 200 amino acids. Such TSLPR polypeptide fragments may optionally comprise an amino-terminal methionine residue. It will be appreciated that such fragments can be used, for example, to generate antibodies to TSLPR polypeptides.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

The term "TSLPR polypeptide ortholog" refers to a polypeptide from another species that corresponds to TSLPR polypeptide amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8. For example, mouse and human TSLPR polypeptides are considered orthologs of each other.

5 The term "TSLPR polypeptide variants" refers to TSLPR polypeptides comprising amino acid sequences having one or more amino acid sequence substitutions, deletions (such as internal deletions and/or TSLPR polypeptide fragments), and/or additions (such as internal additions and/or TSLPR fusion polypeptides) as compared to the TSLPR polypeptide amino acid sequence set forth
10 in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 (with or without a leader sequence). Variants may be naturally occurring (e.g., TSLPR polypeptide allelic variants, TSLPR polypeptide orthologs, and TSLPR polypeptide splice variants) or artificially constructed. Such TSLPR polypeptide variants may be prepared from the corresponding nucleic acid molecules having a DNA sequence that varies accordingly
15 from the DNA sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, or SEQ ID NO: 11. In preferred embodiments, the variants have from 1 to 3, or from 1 to 5, or from 1 to 10, or from 1 to 15, or from 1 to 20, or from 1 to 25, or from 1 to 50, or from 1 to 75, or from 1 to 100, or more than 100 amino acid substitutions, insertions, additions and/or deletions, wherein the
20 substitutions may be conservative, or non-conservative, or any combination thereof.

The term "TSLPR polypeptide derivatives" refers to the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8, TSLPR polypeptide fragments, TSLPR polypeptide orthologs, or TSLPR polypeptide variants, as defined herein, that have been chemically modified. The term "TSLPR polypeptide
25 derivatives" also refers to the polypeptides encoded by TSLPR polypeptide allelic variants or TSLPR polypeptide splice variants, as defined herein, that have been chemically modified.

The term "mature TSLPR polypeptide" refers to a TSLPR polypeptide lacking a leader sequence. A mature TSLPR polypeptide may also include other
30 modifications such as proteolytic processing of the amino-terminus (with or without a leader sequence) and/or the carboxyl-terminus, cleavage of a smaller polypeptide from a larger precursor, N-linked and/or O-linked glycosylation, and the like. Exemplary mature TSLPR polypeptides are depicted by the amino acid sequences as set forth in SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, and SEQ ID NO: 9.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

The term "TSLPR fusion polypeptide" refers to a fusion of one or more amino acids (such as a heterologous protein or peptide) at the amino- or carboxyl-terminus of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8, TSLPR polypeptide fragments, TSLPR polypeptide orthologs, TSLPR polypeptide variants, or TSLPR derivatives, as defined herein. The term "TSLPR fusion polypeptide" also refers to a fusion of one or more amino acids at the amino- or carboxyl-terminus of the polypeptide encoded by TSLPR polypeptide allelic variants or TSLPR polypeptide splice variants, as defined herein.

The term "biologically active TSLPR polypeptides" refers to TSLPR polypeptides having at least one activity characteristic of the polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8. In addition, a TSLPR polypeptide may be active as an immunogen; that is, the TSLPR polypeptide contains at least one epitope to which antibodies may be raised.

The term "isolated polypeptide" refers to a polypeptide of the present invention that (1) has been separated from at least about 50 percent of polynucleotides, lipids, carbohydrates, or other materials with which it is naturally found when isolated from the source cell, (2) is not linked (by covalent or noncovalent interaction) to all or a portion of a polypeptide to which the "isolated polypeptide" is linked in nature, (3) is operably linked (by covalent or noncovalent interaction) to a polypeptide with which it is not linked in nature, or (4) does not occur in nature. Preferably, the isolated polypeptide is substantially free from any other contaminating polypeptides or other contaminants that are found in its natural environment that would interfere with its therapeutic, diagnostic, prophylactic or research use.

The term "identity," as known in the art, refers to a relationship between the sequences of two or more polypeptide molecules or two or more nucleic acid molecules, as determined by comparing the sequences. In the art, "identity" also means the degree of sequence relatedness between nucleic acid molecules or polypeptides, as the case may be, as determined by the match between strings of two or more nucleotide or two or more amino acid sequences. "Identity" measures the percent of identical matches between the smaller of two or more sequences with gap alignments (if any) addressed by a particular mathematical model or computer program (*i.e.*, "algorithms").

WO 02/00724

PCT/US01/20820

The term "similarity" is a related concept, but in contrast to "identity," "similarity" refers to a measure of relatedness which includes both identical matches and conservative substitution matches. If two polypeptide sequences have, for example, 10/20 identical amino acids, and the remainder are all non-conservative substitutions, then the percent identity and similarity would both be 50%. If in the same example, there are five more positions where there are conservative substitutions, then the percent identity remains 50%, but the percent similarity would be 75% (15/20). Therefore, in cases where there are conservative substitutions, the percent similarity between two polypeptides will be higher than the percent identity between those two polypeptides.

The term "naturally occurring" or "native" when used in connection with biological materials such as nucleic acid molecules, polypeptides, host cells, and the like, refers to materials which are found in nature and are not manipulated by man. Similarly, "non-naturally occurring" or "non-native" as used herein refers to a material that is not found in nature or that has been structurally modified or synthesized by man.

The terms "effective amount" and "therapeutically effective amount" each refer to the amount of a TSLPR polypeptide or TSLPR nucleic acid molecule used to support an observable level of one or more biological activities of the TSLPR polypeptides as set forth herein.

The term "pharmaceutically acceptable carrier" or "physiologically acceptable carrier" as used herein refers to one or more formulation materials suitable for accomplishing or enhancing the delivery of the TSLPR polypeptide, TSLPR nucleic acid molecule, or TSLPR selective binding agent as a pharmaceutical composition.

The term "antigen" refers to a molecule or a portion of a molecule capable of being bound by a selective binding agent, such as an antibody, and additionally capable of being used in an animal to produce antibodies capable of binding to an epitope of that antigen. An antigen may have one or more epitopes.

The term "selective binding agent" refers to a molecule or molecules having specificity for a TSLPR polypeptide. As used herein, the terms, "specific" and "specificity" refer to the ability of the selective binding agents to bind to human TSLPR polypeptides and not to bind to human non-TSLPR polypeptides. It will be appreciated, however, that the selective binding agents may also bind orthologs of the

WO 02/00724

PCT/US01/20820

polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8, that is, interspecies versions thereof, such as mouse and rat TSLPR polypeptides.

The term "transduction" is used to refer to the transfer of genes from one bacterium to another, usually by a phage. "Transduction" also refers to the acquisition and transfer of eukaryotic cellular sequences by retroviruses.

The term "transfection" is used to refer to the uptake of foreign or exogenous DNA by a cell, and a cell has been "transfected" when the exogenous DNA has been introduced inside the cell membrane. A number of transfection techniques are well known in the art and are disclosed herein. See, e.g., 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); and Chu *et al.*, 1981, *Gene* 13:197. Such techniques can be used to introduce one or more exogenous DNA moieties into suitable host cells.

The term "transformation" as used herein refers to a change in a cell's genetic characteristics, and a cell has been transformed when it has been modified to contain a new DNA. For example, a cell is transformed where it is genetically modified from its native state. Following transfection or transduction, the transforming DNA may recombine with that of the cell by physically integrating into a chromosome of the cell, may be maintained transiently as an episomal element without being replicated, or may replicate independently as a plasmid. A cell is considered to have been stably transformed when the DNA is replicated with the division of the cell.

Relatedness of Nucleic Acid Molecules and/or Polypeptides

It is understood that related nucleic acid molecules include allelic or splice variants of the nucleic acid molecule of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, or SEQ ID NO: 11, and include sequences which are complementary to any of the above nucleotide sequences. Related nucleic acid molecules also include a nucleotide sequence encoding a polypeptide comprising or consisting essentially of a substitution, modification, addition and/or deletion of one or more amino acid residues compared to the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8. Such related TSLPR polypeptides may comprise, for example, an addition and/or a deletion of one or more N-linked or O-linked glycosylation sites or an addition and/or a deletion of one or more cysteine residues.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

Related nucleic acid molecules also include fragments of TSLPR nucleic acid molecules which encode a polypeptide of at least about 25 contiguous amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or about 150 amino acids, or about 200 amino acids, or more than 200 amino acid residues of the TSLPR polypeptide of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8.

In addition, related TSLPR nucleic acid molecules also include those molecules which comprise nucleotide sequences which hybridize under moderately or highly stringent conditions as defined herein with the fully complementary sequence of the TSLPR nucleic acid molecule of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, or SEQ ID NO: 11, or of a molecule encoding a polypeptide, which polypeptide comprises the amino acid sequence as shown in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8, or of a nucleic acid fragment as defined herein, or of a nucleic acid fragment encoding a polypeptide as defined herein. Hybridization probes may be prepared using the TSLPR sequences provided herein to screen cDNA, genomic or synthetic DNA libraries for related sequences. Regions of the DNA and/or amino acid sequence of TSLPR polypeptide that exhibit significant identity to known sequences are readily determined using sequence alignment algorithms as described herein and those regions may be used to design probes for screening.

The term "highly stringent conditions" refers to those conditions that are designed to permit hybridization of DNA strands whose sequences are highly complementary, and to exclude hybridization of significantly mismatched DNAs. Hybridization stringency is principally determined by temperature, ionic strength, and the concentration of denaturing agents such as formamide. Examples of "highly stringent conditions" for hybridization and washing are 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate at 65-68°C or 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate, and 50% formamide at 42°C. See Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Anderson *et al.*, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach* Ch. 4 (IRL Press Limited).

More stringent conditions (such as higher temperature, lower ionic strength, higher formamide, or other denaturing agent) may also be used-- however, the rate of hybridization will be affected. Other agents may be included in the hybridization and washing buffers for the purpose of reducing non-specific and/or background

WO 02/00724

PCT/US01/20820

hybridization. Examples are 0.1% bovine serum albumin, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% sodium pyrophosphate, 0.1% sodium dodecylsulfate, NaDodSO₄, (SDS), ficoll, Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (or another non-complementary DNA), and dextran sulfate, although other suitable agents can also be used. The concentration and types of these additives can be changed without substantially affecting the stringency of the hybridization conditions. Hybridization experiments are usually carried out at pH 6.8-7.4; however, at typical ionic strength conditions, the rate of hybridization is nearly independent of pH. See Anderson *et al.*, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach* Ch. 4 (IRL Press Limited).

Factors affecting the stability of DNA duplex include base composition, length, and degree of base pair mismatch. Hybridization conditions can be adjusted by one skilled in the art in order to accommodate these variables and allow DNAs of different sequence relatedness to form hybrids. The melting temperature of a perfectly matched DNA duplex can be estimated by the following equation:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6(\log[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G+C) - 600/N - 0.72(\%\text{formamide})$$

where N is the length of the duplex formed, [Na⁺] is the molar concentration of the sodium ion in the hybridization or washing solution, %G+C is the percentage of (guanine+cytosine) bases in the hybrid. For imperfectly matched hybrids, the melting temperature is reduced by approximately 1°C for each 1% mismatch.

The term "moderately stringent conditions" refers to conditions under which a DNA duplex with a greater degree of base pair mismatching than could occur under "highly stringent conditions" is able to form. Examples of typical "moderately stringent conditions" are 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate at 50-65°C or 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate, and 20% formamide at 37-50°C. By way of example, "moderately stringent conditions" of 50°C in 0.015 M sodium ion will allow about a 21% mismatch.

It will be appreciated by those skilled in the art that there is no absolute distinction between "highly stringent conditions" and "moderately stringent conditions." For example, at 0.015 M sodium ion (no formamide), the melting temperature of perfectly matched long DNA is about 71°C. With a wash at 65°C (at the same ionic strength), this would allow for approximately a 6% mismatch. To capture more distantly related sequences, one skilled in the art can simply lower the temperature or raise the ionic strength.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

A good estimate of the melting temperature in 1M NaCl* for oligonucleotide probes up to about 20nt is given by:

$$T_m = 2^{\circ}\text{C per A-T base pair} + 4^{\circ}\text{C per G-C base pair}$$

*The sodium ion concentration in 6X salt sodium citrate (SSC) is 1M. See Suggs *et al.*, *Developmental Biology Using Purified Genes* 683 (Brown and Fox, eds., 1981).

High stringency washing conditions for oligonucleotides are usually at a temperature of 0-5°C below the T_m of the oligonucleotide in 6X SSC, 0.1% SDS.

In another embodiment, related nucleic acid molecules comprise or consist of a nucleotide sequence that is at least about 70 percent identical to the nucleotide sequence as shown in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, or SEQ ID NO: 11, or comprise or consist essentially of a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8. In preferred embodiments, the nucleotide sequences are about 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to the nucleotide sequence as shown in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, or SEQ ID NO: 11, or the nucleotide sequences encode a polypeptide that is about 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to the polypeptide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8. Related nucleic acid molecules encode polypeptides possessing at least one activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8.

Differences in the nucleic acid sequence may result in conservative and/or non-conservative modifications of the amino acid sequence relative to the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8.

Conservative modifications to the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 (and the corresponding modifications to the encoding nucleotides) will produce a polypeptide having functional and chemical characteristics similar to those of TSLPR polypeptides. In contrast, substantial modifications in the functional and/or chemical characteristics of TSLPR polypeptides may be accomplished by selecting substitutions in the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the molecular backbone

WO 02/00724

PCT/US01/20820

in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain.

For example, a "conservative amino acid substitution" may involve a substitution of a native amino acid residue with a nonnative residue such that there is little or no effect on the polarity or charge of the amino acid residue at that position. Furthermore, any native residue in the polypeptide may also be substituted with alanine, as has been previously described for "alanine scanning mutagenesis."

Conservative amino acid substitutions also encompass non-naturally occurring amino acid residues that are typically incorporated by chemical peptide synthesis rather than by synthesis in biological systems. These include peptidomimetics, and other reversed or inverted forms of amino acid moieties.

Naturally occurring residues may be divided into classes based on common side chain properties:

- 1) hydrophobic: norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr;
- 3) acidic: Asp, Glu;
- 4) basic: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- 5) residues that influence chain orientation: Gly, Pro; and
- 6) aromatic: Trp, Tyr, Phe.

For example, non-conservative substitutions may involve the exchange of a member of one of these classes for a member from another class. Such substituted residues may be introduced into regions of the human TSLPR polypeptide that are homologous with non-human TSLPR polypeptides, or into the non-homologous regions of the molecule.

In making such changes, the hydropathic index of amino acids may be considered. Each amino acid has been assigned a hydropathic index on the basis of its hydrophobicity and charge characteristics. The hydropathic indices are: isoleucine (+4.5); valine (+4.2); leucine (+3.8); phenylalanine (+2.8); cysteine/cystine (+2.5); methionine (+1.9); alanine (+1.8); glycine (-0.4); threonine (-0.7); serine (-0.8); tryptophan (-0.9); tyrosine (-1.3); proline (-1.6); histidine (-3.2); glutamate (-3.5); glutamine (-3.5); aspartate (-3.5); asparagine (-3.5); lysine (-3.9); and arginine (-4.5).

WO 02/00724

PCT/US01/20820

The importance of the hydrophobic amino acid index in conferring interactive biological function on a protein is generally understood in the art (Kyte *et al.*, 1982, *J. Mol. Biol.* 157:105-31). It is known that certain amino acids may be substituted for other amino acids having a similar hydrophobic index or score and still retain a similar biological activity. In making changes based upon the hydrophobic index, the substitution of amino acids whose hydrophobic indices are within ± 2 is preferred, those which are within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred.

It is also understood in the art that the substitution of like amino acids can be made effectively on the basis of hydrophilicity, particularly where the biologically functionally equivalent protein or peptide thereby created is intended for use in immunological embodiments, as in the present case. The greatest local average hydrophilicity of a protein, as governed by the hydrophilicity of its adjacent amino acids, correlates with its immunogenicity and antigenicity, *i.e.*, with a biological property of the protein.

The following hydrophilicity values have been assigned to these amino acid residues: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate (+3.0 \pm 1); glutamate (+3.0 \pm 1); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); threonine (-0.4); proline (-0.5 \pm 1); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); and tryptophan (-3.4). In making changes based upon similar hydrophilicity values, the substitution of amino acids whose hydrophilicity values are within ± 2 is preferred, those which are within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred. One may also identify epitopes from primary amino acid sequences on the basis of hydrophilicity. These regions are also referred to as "epitopic core regions."

Desired amino acid substitutions (whether conservative or non-conservative) can be determined by those skilled in the art at the time such substitutions are desired. For example, amino acid substitutions can be used to identify important residues of the TSLPR polypeptide, or to increase or decrease the affinity of the TSLPR polypeptides described herein. Exemplary amino acid substitutions are set forth in Table I.

Table I

WO 02/00724

PCT/US01/20820

Amino Acid Substitutions		
Original Residues	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
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, Norleucine	Leu
Leu	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 Diamino-butyric Acid, 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, Norleucine	Leu

A skilled artisan will be able to determine suitable variants of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 using well known techniques. For identifying suitable areas of the molecule that may be changed without destroying biological activity, one skilled in the art may target areas not believed to be important for activity. For example, when similar polypeptides

WO 02/00724

PCT/US01/20820

with similar activities from the same species or from other species are known, one skilled in the art may compare the amino acid sequence of a TSLPR polypeptide to such similar polypeptides. With such a comparison, one can identify residues and portions of the molecules that are conserved among similar polypeptides. It will be appreciated that changes in areas of the TSLPR molecule that are not conserved relative to such similar polypeptides would be less likely to adversely affect the biological activity and/or structure of a TSLPR polypeptide. One skilled in the art would also know that, even in relatively conserved regions, one may substitute chemically similar amino acids for the naturally occurring residues while retaining activity (conservative amino acid residue substitutions). Therefore, even areas that may be important for biological activity or for structure may be subject to conservative amino acid substitutions without destroying the biological activity or without adversely affecting the polypeptide structure.

Additionally, one skilled in the art can review structure-function studies identifying residues in similar polypeptides that are important for activity or structure. In view of such a comparison, one can predict the importance of amino acid residues in a TSLPR polypeptide that correspond to amino acid residues that are important for activity or structure in similar polypeptides. One skilled in the art may opt for chemically similar amino acid substitutions for such predicted important amino acid residues of TSLPR polypeptides.

One skilled in the art can also analyze the three-dimensional structure and amino acid sequence in relation to that structure in similar polypeptides. In view of such information, one skilled in the art may predict the alignment of amino acid residues of TSLPR polypeptide with respect to its three dimensional structure. One skilled in the art may choose not to make radical changes to amino acid residues predicted to be on the surface of the protein, since such residues may be involved in important interactions with other molecules. Moreover, one skilled in the art may generate test variants containing a single amino acid substitution at each amino acid residue. The variants could be screened using activity assays known to those with skill in the art. Such variants could be used to gather information about suitable variants. For example, if one discovered that a change to a particular amino acid residue resulted in destroyed, undesirably reduced, or unsuitable activity, variants with such a change would be avoided. In other words, based on information gathered from such routine experiments, one skilled in the art can readily determine the amino

WO 02/00724

PCT/US01/20820

acids where further substitutions should be avoided either alone or in combination with other mutations.

A number of scientific publications have been devoted to the prediction of secondary structure. See 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; and Chou et al., 1979, *Biophys. J.* 26:367-84. Moreover, computer programs are currently available to assist with predicting secondary structure. One method of predicting secondary structure is based upon homology modeling. For example, two polypeptides or proteins which have a sequence identity of greater than 30%, or similarity greater than 40%, often have similar structural topologies. The recent growth of the protein structural database (PDB) has provided enhanced predictability of secondary structure, including the potential number of folds within the structure of a polypeptide or protein. See Holm et al., 1999, *Nucleic Acids Res.* 27:244-47. It has been suggested that there are a limited number of folds in a given polypeptide or protein and that once a critical number of structures have been resolved, structural prediction will become dramatically more accurate (Brenner et al., 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:369-76).

Additional methods of predicting secondary structure include "threading" (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-87; Sippl et al., 1996, *Structure* 4:15-19), "profile analysis" (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), and "evolutionary linkage" (See Holm et al., *supra*, and Brenner et al., *supra*).

Preferred TSLPR polypeptide variants include glycosylation variants wherein the number and/or type of glycosylation sites have been altered compared to the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8. In one embodiment, TSLPR polypeptide variants comprise a greater or a lesser number of N-linked glycosylation sites than the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8. An N-linked glycosylation site is characterized by the sequence: Asn-X-Ser or Asn-X-Thr, wherein the amino acid residue designated as X may be any amino acid residue except proline. The substitution of amino acid residues to create this sequence provides a potential new site for the addition of an N-linked carbohydrate chain. Alternatively,

WO 02/00724

PCT/US01/20820

substitutions that eliminate this sequence will remove an existing N-linked carbohydrate chain. Also provided is a rearrangement of N-linked carbohydrate chains wherein one or more N-linked glycosylation sites (typically those that are naturally occurring) are eliminated and one or more new N-linked sites are created.

5 Additional preferred TSLPR variants include cysteine variants, wherein one or more cysteine residues are deleted or substituted with another amino acid (e.g., serine) as compared to the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8. Cysteine variants are useful when TSLPR polypeptides must be refolded into a biologically active conformation such as after the isolation of insoluble
10 inclusion bodies. Cysteine variants generally have fewer cysteine residues than the native protein, and typically have an even number to minimize interactions resulting from unpaired cysteines.

In other embodiments, related nucleic acid molecules comprise or consist of a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2,
15 SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 with at least one amino acid insertion and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8, or a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 with at least one amino acid deletion and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set
20 forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8. Related nucleic acid molecules also comprise or consist of a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 wherein the polypeptide has a carboxyl- and/or amino-terminal truncation and further wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID
25 NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8. Related nucleic acid molecules also comprise or consist of a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, carboxyl-terminal truncations, and amino-
30 terminal truncations and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8.

In addition, the polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8, or other TSLPR polypeptide, may be fused to a homologous polypeptide to form a homodimer or to a heterologous

WO 02/00724

PCT/US01/20820

polypeptide to form a heterodimer. Heterologous peptides and polypeptides include, but are not limited to: an epitope to allow for the detection and/or isolation of a TSLPR fusion polypeptide; a transmembrane receptor protein or a portion thereof, such as an extracellular domain or a transmembrane and intracellular domain; a ligand
5 or a portion thereof which binds to a transmembrane receptor protein; an enzyme or portion thereof which is catalytically active; a polypeptide or peptide which promotes oligomerization, such as a leucine zipper domain; a polypeptide or peptide which increases stability, such as an immunoglobulin constant region; and a polypeptide which has a therapeutic activity different from the polypeptide comprising the amino
10 acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8, or other TSLPR polypeptide.

Fusions can be made either at the amino-terminus or at the carboxyl-terminus of the polypeptide comprising the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8, or other TSLPR polypeptide. Fusions may
15 be direct with no linker or adapter molecule or may be through a linker or adapter molecule. A linker or adapter molecule may be one or more amino acid residues, typically from about 20 to about 50 amino acid residues. A linker or adapter molecule may also be designed with a cleavage site for a DNA restriction endonuclease or for a protease to allow for the separation of the fused moieties. It
20 will be appreciated that once constructed, the fusion polypeptides can be derivatized according to the methods described herein.

In a further embodiment of the invention, the polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8, or other TSLPR polypeptide, is fused to one or more domains of an Fc region of human
25 IgG. Antibodies comprise two functionally independent parts, a variable domain known as "Fab," that binds an antigen, and a constant domain known as "Fc," that is involved in effector functions such as complement activation and attack by phagocytic cells. An Fc has a long serum half-life, whereas an Fab is short-lived. Capon *et al.*, 1989, *Nature* 337:525-31. When constructed together with a therapeutic
30 protein, an Fc domain can provide longer half-life or incorporate such functions as Fc receptor binding, protein A binding, complement fixation, and perhaps even placental transfer. *Id.* Table II summarizes the use of certain Fc fusions known in the art.

Table II

WO 02/00724

PCT/US01/20820

Fc Fusion with Therapeutic Proteins

Form of Fc	Fusion partner	Therapeutic implications	Reference
IgG1	N-terminus of CD30-L	Hodgkin's disease; anaplastic lymphoma; T-cell leukemia	U.S. Patent No. 5,480,981
Murine Fc γ 2a	IL-10	anti-inflammatory; transplant rejection	Zheng <i>et al.</i> , 1995, <i>J. Immunol.</i> 154:5590-600
IgG1	TNF receptor	septic shock	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, or IgE (excluding the first domain)	TNF receptor	inflammation, autoimmune disorders	U.S. Patent No. 5,808,029
IgG1	CD4 receptor	AIDS	Capon <i>et al.</i> , 1989, <i>Nature</i> 337: 525-31
IgG1, IgG3	N-terminus of IL-2	anti-cancer, antiviral	Harvill <i>et al.</i> , 1995, <i>Immunotech.</i> 1:95-105
IgG1	C-terminus of OPG	osteoarthritis; bone density	WO 97/23614
IgG1	N-terminus of leptin	anti-obesity	PCT/US 97/23183, filed December 11, 1997
Human Ig C γ 1	CTLA-4	autoimmune disorders	Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-69

In one example, a human IgG hinge, CH2, and CH3 region may be fused at either the amino-terminus or carboxyl-terminus of the TSLPR polypeptides using methods known to the skilled artisan. In another example, a human IgG hinge, CH2, and CH3 region may be fused at either the amino-terminus or carboxyl-terminus of a TSLPR polypeptide fragment (*e.g.*, the predicted extracellular portion of TSLPR polypeptide).

The resulting TSLPR fusion polypeptide may be purified by use of a Protein A affinity column. Peptides and proteins fused to an Fc region have been found to exhibit a substantially greater half-life *in vivo* than the unfused counterpart. Also, a fusion to an Fc region allows for dimerization/multimerization of the fusion polypeptide. The Fc region may be a naturally occurring Fc region, or may be altered to improve certain qualities, such as therapeutic qualities, circulation time, or reduced aggregation.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

Identity and similarity of related nucleic acid molecules and polypeptides are readily calculated by known methods. Such methods include, but are not limited to those described in *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* (Part 1, A.M. Griffin and H.G. Griffin, eds., Humana Press 1994); G. von Heinle, *Sequence Analysis in Molecular Biology* (Academic Press 1987); *Sequence Analysis Primer* (M. Gribskov and J. Devereux, eds., M. Stockton Press 1991); and Carillo *et al.*, 1988, *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073.

10 Preferred methods to determine identity and/or similarity are designed to give the largest match between the sequences tested. Methods to determine identity and similarity are described in publicly available computer programs. Preferred computer program methods to determine identity and similarity between two sequences include, but are not limited to, the GCG program package, including GAP (Devereux *et al.*, 15 1984, *Nucleic Acids Res.* 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-10). The BLASTX program is publicly available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and other sources (Altschul *et al.*, *BLAST Manual* (NCB NLM NIH, Bethesda, MD); Altschul *et al.*, 1990, *supra*).

20 The well-known Smith Waterman algorithm may also be used to determine identity.

Certain alignment schemes for aligning two amino acid sequences may result in the matching of only a short region of the two sequences, and this small aligned region may have very high sequence identity even though there is no significant relationship between the two full-length sequences. Accordingly, in a preferred 25 embodiment, the selected alignment method (GAP program) will result in an alignment that spans at least 50 contiguous amino acids of the claimed polypeptide.

For example, using the computer algorithm GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), two polypeptides for which the percent sequence identity is to be determined are aligned for optimal matching of their 30 respective amino acids (the "matched span," as determined by the algorithm). A gap opening penalty (which is calculated as 3X the average diagonal; the "average diagonal" is the average of the diagonal of the comparison matrix being used; the "diagonal" is the score or number assigned to each perfect amino acid match by the particular comparison matrix) and a gap extension penalty (which is usually 0.1X the

WO 02/00724

PCT/US01/20820

gap opening penalty), as well as a comparison matrix such as PAM 250 or BLOSUM 62 are used in conjunction with the algorithm. A standard comparison matrix is also used by the algorithm (see Dayhoff *et al.*, 5 *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Supp. 3 1978)(PAM250 comparison matrix); Henikoff *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:10915-19 (BLOSUM 62 comparison matrix)).

Preferred parameters for polypeptide sequence comparison include the following:

Algorithm: Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443-53;
Comparison matrix: BLOSUM 62 (Henikoff *et al.*, *supra*);
Gap Penalty: 12
Gap Length Penalty: 4
Threshold of Similarity: 0

The GAP program is useful with the above parameters. The aforementioned parameters are the default parameters for polypeptide comparisons (along with no penalty for end gaps) using the GAP algorithm.

Preferred parameters for nucleic acid molecule sequence comparison include the following:

Algorithm: Needleman and Wunsch, *supra*;
Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0
Gap Penalty: 50
Gap Length Penalty: 3

The GAP program is also useful with the above parameters. The aforementioned parameters are the default parameters for nucleic acid molecule comparisons.

Other exemplary algorithms, gap opening penalties, gap extension penalties, comparison matrices, and thresholds of similarity may be used, including those set forth in the Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997. The particular choices to be made will be apparent to those of skill in the art and will depend on the specific comparison to be made, such as DNA-to-DNA, protein-to-protein, protein-to-DNA; and additionally, whether the comparison is between given pairs of sequences (in which case GAP or BestFit are generally preferred) or between

WO 02/00724

PCT/US01/20820

one sequence and a large database of sequences (in which case FASTA or BLASTA are preferred).

Nucleic Acid Molecules

5 The nucleic acid molecules encoding a polypeptide comprising the amino acid sequence of a TSLPR polypeptide can readily be obtained in a variety of ways including, without limitation, chemical synthesis, cDNA or genomic library screening, expression library screening, and/or PCR amplification of cDNA.

10 Recombinant DNA methods used herein are generally those set forth in Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) and/or *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994). The invention provides for nucleic acid molecules as described herein and methods for obtaining such molecules.

15 Where a gene encoding the amino acid sequence of a TSLPR polypeptide has been identified from one species, all or a portion of that gene may be used as a probe to identify orthologs or related genes from the same species. The probes or primers may be used to screen cDNA libraries from various tissue sources believed to express the TSLPR polypeptide. In addition, part or all of a nucleic acid molecule having the
20 sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, or SEQ ID NO: 11 may be used to screen a genomic library to identify and isolate a gene encoding the amino acid sequence of a TSLPR polypeptide. Typically, conditions of moderate or high stringency will be employed for screening to minimize the number of false positives obtained from the screening.

25 Nucleic acid molecules encoding the amino acid sequence of TSLPR polypeptides may also be identified by expression cloning which employs the detection of positive clones based upon a property of the expressed protein. Typically, nucleic acid libraries are screened by the binding an antibody or other
30 binding partner (*e.g.*, receptor or ligand) to cloned proteins that are expressed and displayed on a host cell surface. The antibody or binding partner is modified with a detectable label to identify those cells expressing the desired clone.

Recombinant expression techniques conducted in accordance with the descriptions set forth below may be followed to produce these polynucleotides and to express the encoded polypeptides. For example, by inserting a nucleic acid sequence

WO 02/00724

PCT/US01/20820

that encodes the amino acid sequence of a TSLPR polypeptide into an appropriate vector, one skilled in the art can readily produce large quantities of the desired nucleotide sequence. The sequences can then be used to generate detection probes or amplification primers. Alternatively, a polynucleotide encoding the amino acid sequence of a TSLPR polypeptide can be inserted into an expression vector. By introducing the expression vector into an appropriate host, the encoded TSLPR polypeptide may be produced in large amounts.

Another method for obtaining a suitable nucleic acid sequence is the polymerase chain reaction (PCR). In this method, cDNA is prepared from poly(A)+RNA or total RNA using the enzyme reverse transcriptase. Two primers, typically complementary to two separate regions of cDNA encoding the amino acid sequence of a TSLPR polypeptide, are then added to the cDNA along with a polymerase such as *Taq* polymerase, and the polymerase amplifies the cDNA region between the two primers.

Another means of preparing a nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a TSLPR polypeptide is chemical synthesis using methods well known to the skilled artisan such as those described by Engels *et al.*, 1989, *Angew. Chem. Intl. Ed.* 28:716-34. These methods include, *inter alia*, the phosphotriester, phosphoramidite, and H-phosphonate methods for nucleic acid synthesis. A preferred method for such chemical synthesis is polymer-supported synthesis using standard phosphoramidite chemistry. Typically, the DNA encoding the amino acid sequence of a TSLPR polypeptide will be several hundred nucleotides in length. Nucleic acids larger than about 100 nucleotides can be synthesized as several fragments using these methods. The fragments can then be ligated together to form the full-length nucleotide sequence of a TSLPR gene. Usually, the DNA fragment encoding the amino-terminus of the polypeptide will have an ATG, which encodes a methionine residue. This methionine may or may not be present on the mature form of the TSLPR polypeptide, depending on whether the polypeptide produced in the host cell is designed to be secreted from that cell. Other methods known to the skilled artisan may be used as well.

In certain embodiments, nucleic acid variants contain codons which have been altered for optimal expression of a TSLPR polypeptide in a given host cell. Particular codon alterations will depend upon the TSLPR polypeptide and host cell selected for expression. Such "codon optimization" can be carried out by a variety of methods,

WO 02/00724

PCT/US01/20820

for example, by selecting codons which are preferred for use in highly expressed genes in a given host cell. Computer algorithms which incorporate codon frequency tables such as "Eco_high.Cod" for codon preference of highly expressed bacterial genes may be used and are provided by the University of Wisconsin Package Version 5 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI). Other useful codon frequency tables include "Celegans_high.cod," "Celegans_low.cod," "Drosophila_high.cod," "Human_high.cod," "Maize_high.cod," and "Yeast_high.cod."

In some cases, it may be desirable to prepare nucleic acid molecules encoding TSLPR polypeptide variants. Nucleic acid molecules encoding variants may be produced using site directed mutagenesis, PCR amplification, or other appropriate 10 methods, where the primer(s) have the desired point mutations (*see* Sambrook *et al.*, *supra*, and Ausubel *et al.*, *supra*, for descriptions of mutagenesis techniques). Chemical synthesis using methods described by Engels *et al.*, *supra*, may also be used to prepare such variants. Other methods known to the skilled artisan may be used 15 well.

Vectors and Host Cells

A nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a TSLPR polypeptide is inserted into an appropriate expression vector using standard ligation 20 techniques. The vector is typically selected to be functional in the particular host cell employed (*i.e.*, the vector is compatible with the host cell machinery such that amplification of the gene and/or expression of the gene can occur). A nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a TSLPR polypeptide may be amplified/expressed in prokaryotic, yeast, insect (baculovirus systems) and/or 25 eukaryotic host cells. Selection of the host cell will depend in part on whether a TSLPR polypeptide is to be post-translationally modified (*e.g.*, glycosylated and/or phosphorylated). If so, yeast, insect, or mammalian host cells are preferable. For a review of expression vectors, *see Meth. Enz.*, vol. 185 (D.V. Goeddel, ed., Academic Press 1990).

30 Typically, expression vectors used in any of the host cells will contain sequences for plasmid maintenance and for cloning and expression of exogenous nucleotide sequences. Such sequences, collectively referred to as "flanking sequences" in certain embodiments will typically include one or more of the following nucleotide sequences: a promoter, one or more enhancer sequences, an

WO 02/00724

PCT/US01/20820

origin of replication, a transcriptional termination sequence, a complete intron sequence containing a donor and acceptor splice site, a sequence encoding a leader sequence for polypeptide secretion, a ribosome binding site, a polyadenylation sequence, a polylinker region for inserting the nucleic acid encoding the polypeptide
5 to be expressed, and a selectable marker element. Each of these sequences is discussed below.

Optionally, the vector may contain a "tag"-encoding sequence, *i.e.*, an oligonucleotide molecule located at the 5' or 3' end of the TSLPR polypeptide coding sequence; the oligonucleotide sequence encodes polyHis (such as hexaHis), or
10 another "tag" such as FLAG, HA (hemagglutinin influenza virus), or *myc* for which commercially available antibodies exist. This tag is typically fused to the polypeptide upon expression of the polypeptide, and can serve as a means for affinity purification of the TSLPR polypeptide from the host cell. Affinity purification can be accomplished, for example, by column chromatography using antibodies against the
15 tag as an affinity matrix. Optionally, the tag can subsequently be removed from the purified TSLPR polypeptide by various means such as using certain peptidases for cleavage.

Flanking sequences may be homologous (*i.e.*, from the same species and/or strain as the host cell), heterologous (*i.e.*, from a species other than the host cell
20 species or strain), hybrid (*i.e.*, a combination of flanking sequences from more than one source), or synthetic, or the flanking sequences may be native sequences which normally function to regulate TSLPR polypeptide expression. As such, the source of a flanking sequence may be any prokaryotic or eukaryotic organism, any vertebrate or invertebrate organism, or any plant, provided that the flanking sequence is functional
25 in, and can be activated by, the host cell machinery.

Flanking sequences useful in the vectors of this invention may be obtained by any of several methods well known in the art. Typically, flanking sequences useful herein – other than the TSLPR gene flanking sequences – will have been previously
30 identified by mapping and/or by restriction endonuclease digestion and can thus be isolated from the proper tissue source using the appropriate restriction endonucleases. In some cases, the full nucleotide sequence of a flanking sequence may be known. Here, the flanking sequence may be synthesized using the methods described herein for nucleic acid synthesis or cloning.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

Where all or only a portion of the flanking sequence is known, it may be obtained using PCR and/or by screening a genomic library with a suitable oligonucleotide and/or flanking sequence fragment from the same or another species. Where the flanking sequence is not known, a fragment of DNA containing a flanking sequence may be isolated from a larger piece of DNA that may contain, for example, a coding sequence or even another gene or genes. Isolation may be accomplished by restriction endonuclease digestion to produce the proper DNA fragment followed by isolation using agarose gel purification, Qiagen® column chromatography (Chatsworth, CA), or other methods known to the skilled artisan. The selection of suitable enzymes to accomplish this purpose will be readily apparent to one of ordinary skill in the art.

An origin of replication is typically a part of those prokaryotic expression vectors purchased commercially, and the origin aids in the amplification of the vector in a host cell. Amplification of the vector to a certain copy number can, in some cases, be important for the optimal expression of a TSLPR polypeptide. If the vector of choice does not contain an origin of replication site, one may be chemically synthesized based on a known sequence, and ligated into the vector. For example, the origin of replication from the plasmid pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) is suitable for most gram-negative bacteria and various origins (*e.g.*, SV40, polyoma, adenovirus, vesicular stomatitis virus (VSV), or papillomaviruses such as HPV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells. Generally, the origin of replication component is not needed for mammalian expression vectors (for example, the SV40 origin is often used only because it contains the early promoter).

A transcription termination sequence is typically located 3' of the end of a polypeptide coding region and serves to terminate transcription. Usually, a transcription termination sequence in prokaryotic cells is a G-C rich fragment followed by a poly-T sequence. While the sequence is easily cloned from a library or even purchased commercially as part of a vector, it can also be readily synthesized using methods for nucleic acid synthesis such as those described herein.

A selectable marker gene element encodes a protein necessary for the survival and growth of a host cell grown in a selective culture medium. Typical selection marker genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, *e.g.*, ampicillin, tetracycline, or kanamycin for prokaryotic host cells; (b) complement auxotrophic deficiencies of the cell; or (c) supply critical nutrients not available from

WO 02/00724

PCT/US01/20820

complex media. Preferred selectable markers are the kanamycin resistance gene, the ampicillin resistance gene, and the tetracycline resistance gene. A neomycin resistance gene may also be used for selection in prokaryotic and eukaryotic host cells.

5 Other selection genes may be used to amplify the gene that will be expressed. Amplification is the process wherein genes that are in greater demand for the production of a protein critical for growth are reiterated in tandem within the chromosomes of successive generations of recombinant cells. Examples of suitable selectable markers for mammalian cells include dihydrofolate reductase (DHFR) and
10 thymidine kinase. The mammalian cell transformants are placed under selection pressure wherein only the transformants are uniquely adapted to survive by virtue of the selection gene present in the vector. Selection pressure is imposed by culturing the transformed cells under conditions in which the concentration of selection agent in the medium is successively changed, thereby leading to the amplification of both the
15 selection gene and the DNA that encodes a TSLPR polypeptide. As a result, increased quantities of TSLPR polypeptide are synthesized from the amplified DNA.

A ribosome binding site is usually necessary for translation initiation of mRNA and is characterized by a Shine-Dalgarno sequence (prokaryotes) or a Kozak sequence (eukaryotes). The element is typically located 3' to the promoter and 5' to
20 the coding sequence of a TSLPR polypeptide to be expressed. The Shine-Dalgarno sequence is varied but is typically a polypurine (*i.e.*, having a high A-G content). Many Shine-Dalgarno sequences have been identified, each of which can be readily synthesized using methods set forth herein and used in a prokaryotic vector.

A leader, or signal, sequence may be used to direct a TSLPR polypeptide out
25 of the host cell. Typically, a nucleotide sequence encoding the signal sequence is positioned in the coding region of a TSLPR nucleic acid molecule, or directly at the 5' end of a TSLPR polypeptide coding region. Many signal sequences have been identified, and any of those that are functional in the selected host cell may be used in conjunction with a TSLPR nucleic acid molecule. Therefore, a signal sequence may
30 be homologous (naturally occurring) or heterologous to the TSLPR nucleic acid molecule. Additionally, a signal sequence may be chemically synthesized using methods described herein. In most cases, the secretion of a TSLPR polypeptide from the host cell via the presence of a signal peptide will result in the removal of the signal peptide from the secreted TSLPR polypeptide. The signal sequence may be a

WO 02/00724

PCT/US01/20820

component of the vector, or it may be a part of a TSLPR nucleic acid molecule that is inserted into the vector.

Included within the scope of this invention is the use of either a nucleotide sequence encoding a native TSLPR polypeptide signal sequence joined to a TSLPR polypeptide coding region or a nucleotide sequence encoding a heterologous signal sequence joined to a TSLPR polypeptide coding region. The heterologous signal sequence selected should be one that is recognized and processed, *i.e.*, cleaved by a signal peptidase, by the host cell. For prokaryotic host cells that do not recognize and process the native TSLPR polypeptide signal sequence, the signal sequence is substituted by a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion, the native TSLPR polypeptide signal sequence may be substituted by the yeast invertase, alpha factor, or acid phosphatase leaders. In mammalian cell expression the native signal sequence is satisfactory, although other mammalian signal sequences may be suitable.

In some cases, such as where glycosylation is desired in a eukaryotic host cell expression system, one may manipulate the various presequences to improve glycosylation or yield. For example, one may alter the peptidase cleavage site of a particular signal peptide, or add pro-sequences, which also may affect glycosylation. The final protein product may have, in the -1 position (relative to the first amino acid of the mature protein) one or more additional amino acids incident to expression, which may not have been totally removed. For example, the final protein product may have one or two amino acid residues found in the peptidase cleavage site, attached to the amino-terminus. Alternatively, use of some enzyme cleavage sites may result in a slightly truncated form of the desired TSLPR polypeptide, if the enzyme cuts at such area within the mature polypeptide.

In many cases, transcription of a nucleic acid molecule is increased by the presence of one or more introns in the vector; this is particularly true where a polypeptide is produced in eukaryotic host cells, especially mammalian host cells. The introns used may be naturally occurring within the TSLPR gene especially where the gene used is a full-length genomic sequence or a fragment thereof. Where the intron is not naturally occurring within the gene (as for most cDNAs), the intron may be obtained from another source. The position of the intron with respect to flanking sequences and the TSLPR gene is generally important, as the intron must be

WO 02/00724

PCT/US01/20820

transcribed to be effective. Thus, when a TSLPR cDNA molecule is being transcribed, the preferred position for the intron is 3' to the transcription start site and 5' to the poly-A transcription termination sequence. Preferably, the intron or introns will be located on one side or the other (*i.e.*, 5' or 3') of the cDNA such that it does not interrupt the coding sequence. Any intron from any source, including viral, prokaryotic and eukaryotic (plant or animal) organisms, may be used to practice this invention, provided that it is compatible with the host cell into which it is inserted. Also included herein are synthetic introns. Optionally, more than one intron may be used in the vector.

10 The expression and cloning vectors of the present invention will typically contain a promoter that is recognized by the host organism and operably linked to the molecule encoding the TSLPR polypeptide. Promoters are untranscribed sequences located upstream (*i.e.*, 5') to the start codon of a structural gene (generally within about 100 to 1000 bp) that control the transcription of the structural gene. Promoters are conventionally grouped into one of two classes: inducible promoters and constitutive promoters. Inducible promoters initiate increased levels of transcription from DNA under their control in response to some change in culture conditions, such as the presence or absence of a nutrient or a change in temperature. Constitutive promoters, on the other hand, initiate continual gene product production; that is, there is little or no control over gene expression. A large number of promoters, recognized by a variety of potential host cells, are well known. A suitable promoter is operably linked to the DNA encoding TSLPR polypeptide by removing the promoter from the source DNA by restriction enzyme digestion and inserting the desired promoter sequence into the vector. The native TSLPR promoter sequence may be used to direct amplification and/or expression of a TSLPR nucleic acid molecule. A heterologous promoter is preferred, however, if it permits greater transcription and higher yields of the expressed protein as compared to the native promoter, and if it is compatible with the host cell system that has been selected for use.

25 Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the beta-lactamase and lactose promoter systems; alkaline phosphatase; a tryptophan (trp) promoter system; and hybrid promoters such as the tac promoter. Other known bacterial promoters are also suitable. Their sequences have been published, thereby enabling one skilled in the art to ligate them to the desired DNA sequence, using linkers or adapters as needed to supply any useful restriction sites.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

Suitable promoters for use with yeast hosts are also well known in the art. Yeast enhancers are advantageously used with yeast promoters. Suitable promoters for use with mammalian host cells are well known and include, but are not limited to, those obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus, adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, retroviruses, hepatitis-B virus and most preferably Simian Virus 40 (SV40). Other suitable mammalian promoters include heterologous mammalian promoters, for example, heat-shock promoters and the actin promoter.

Additional promoters which may be of interest in controlling TSLPR gene expression include, but are not limited to: the SV40 early promoter region (Bernoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-10); the CMV promoter; the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto, *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-97); the herpes thymidine kinase promoter (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-45); the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brimster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); prokaryotic expression vectors such as the beta-lactamase promoter (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-31); or the tac promoter (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25). Also of interest are the following animal transcriptional control regions, which exhibit tissue specificity and have been utilized in transgenic animals: the elastase I gene control region which is active in pancreatic acinar cells (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); the insulin gene control region which is active in pancreatic beta cells (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-22); the immunoglobulin gene control region which is active in lymphoid cells (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); the mouse mammary tumor virus control region which is active in testicular, breast, lymphoid and mast cells (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-95); the albumin gene control region which is active in liver (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:268-76); the alpha-feto-protein gene control region which is active in liver (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-48; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 235:53-58); the alpha 1-antitrypsin gene control region which is active in the liver (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:161-71); the beta-globin gene control region which is active in myeloid cells (Mogram *et al.*, 1985, *Nature* 315:338-40; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-94); the myelin basic

WO 02/00724

PCT/US01/20820

protein gene control region which is active in oligodendrocyte cells in the brain (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-12); the myosin light chain-2 gene control region which is active in skeletal muscle (Sani, 1985, *Nature* 314:283-86); and the gonadotropic releasing hormone gene control region which is active in the
5 hypothalamus (Mason *et al.*, 1986, *Science* 234:1372-78).

An enhancer sequence may be inserted into the vector to increase the transcription of a DNA encoding a TSLPR polypeptide of the present invention by higher eukaryotes. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually about 10-300 bp in length, that act on the promoter to increase transcription. Enhancers are
10 relatively orientation and position independent. They have been found 5' and 3' to the transcription unit. Several enhancer sequences available from mammalian genes are known (*e.g.*, globin, elastase, albumin, alpha-feto-protein and insulin). Typically, however, an enhancer from a virus will be used. The SV40 enhancer, the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer, and adenovirus
15 enhancers are exemplary enhancing elements for the activation of eukaryotic promoters. While an enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to a TSLPR nucleic acid molecule, it is typically located at a site 5' from the promoter.

Expression vectors of the invention may be constructed from a starting vector such as a commercially available vector. Such vectors may or may not contain all of
20 the desired flanking sequences. Where one or more of the flanking sequences described herein are not already present in the vector, they may be individually obtained and ligated into the vector. Methods used for obtaining each of the flanking sequences are well known to one skilled in the art.

Preferred vectors for practicing this invention are those which are compatible
25 with bacterial, insect, and mammalian host cells. Such vectors include, *inter alia*, pCRII, pCR3, and 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-alpha (PCT Pub. No. WO 90/14363) and pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island,
30 NY).

Additional suitable vectors include, but are not limited to, cosmids, plasmids, or modified viruses, but it will be appreciated that the vector system must be compatible with the selected host cell. Such vectors include, but are not limited to

WO 02/00724

PCT/US01/20820

5 plasmids such as Bluescript[®] plasmid derivatives (a high copy number ColE1-based phagemid; Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA), PCR cloning plasmids designed for cloning Taq-amplified PCR products (*e.g.*, TOPO[™] TA Cloning[®] Kit and PCR2.1[®] plasmid derivatives; Invitrogen), and mammalian, yeast or virus vectors such as a baculovirus expression system (pBacPAK plasmid derivatives; Clontech).

10 After the vector has been constructed and a nucleic acid molecule encoding a TSLPR polypeptide has been inserted into the proper site of the vector, the completed vector may be inserted into a suitable host cell for amplification and/or polypeptide expression. The transformation of an expression vector for a TSLPR polypeptide into a selected host cell may be accomplished by well known methods including methods such as transfection, infection, calcium chloride, electroporation, microinjection, lipofection, DEAE-dextran method, or other known techniques. The method selected will in part be a function of the type of host cell to be used. These methods and other suitable methods are well known to the skilled artisan, and are set forth, for example,

15 in Sambrook *et al.*, *supra*.

Host cells may be prokaryotic host cells (such as *E. coli*) or eukaryotic host cells (such as a yeast, insect, or vertebrate cell). The host cell, when cultured under appropriate conditions, synthesizes a TSLPR polypeptide which can subsequently be collected from the culture medium (if the host cell secretes it into the medium) or directly from the host cell producing it (if it is not secreted). The selection of an appropriate host cell will depend upon various factors, such as desired expression levels, polypeptide modifications that are desirable or necessary for activity (such as glycosylation or phosphorylation) and ease of folding into a biologically active molecule.

25 A number of suitable host cells are known in the art and many are available from the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA. Examples include, but are not limited to, mammalian cells, such as Chinese hamster ovary cells (CHO), CHO DHFR(-) cells (Urlaub *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:4216-20), human embryonic kidney (HEK) 293 or 293T cells, or 3T3 cells. The selection of suitable mammalian host cells and methods for transformation, culture, 30 amplification, screening, product production, and purification are known in the art. Other suitable mammalian cell lines, are the monkey COS-1 and COS-7 cell lines, and the CV-1 cell line. Further exemplary mammalian host cells include primate cell

WO 02/00724

PCT/US01/20820

lines and rodent cell lines, including transformed cell lines. Normal diploid cells, cell strains derived from *in vitro* culture of primary tissue, as well as primary explants, are also suitable. Candidate cells may be genotypically deficient in the selection gene, or may contain a dominantly acting selection gene. Other suitable mammalian cell lines
5 include but are not limited to, mouse neuroblastoma N2A cells, HeLa, mouse L-929 cells, 3T3 lines derived from Swiss, Balb-c or NIH mice, BHK or HaK hamster cell lines. Each of these cell lines is known by and available to those skilled in the art of protein expression.

Similarly useful as host cells suitable for the present invention are bacterial
10 cells. For example, the various strains of *E. coli* (e.g., HB101, DH5 α , DH10, and MC1061) are well-known as host cells in the field of biotechnology. Various strains of *B. subtilis*, *Pseudomonas spp.*, other *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, and the like may also be employed in this method.

Many strains of yeast cells known to those skilled in the art are also available
15 as host cells for the expression of the polypeptides of the present invention. Preferred yeast cells include, for example, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*.

Additionally, where desired, insect cell systems may be utilized in the methods of the present invention. Such systems are described, for example, in Kitts
20 *et al.*, 1993, *Biotechniques*, 14:810-17; Lucklow, 1993, *Curr. Opin. Biotechnol.* 4:564-72; and Lucklow *et al.*, 1993, *J. Virol.*, 67:4566-79. Preferred insect cells are Sf-9 and Hi5 (Invitrogen).

One may also use transgenic animals to express glycosylated TSLPR polypeptides. For example, one may use a transgenic milk-producing animal (a cow or goat, for example) and obtain the present glycosylated polypeptide in the animal
25 milk. One may also use plants to produce TSLPR polypeptides, however, in general, the glycosylation occurring in plants is different from that produced in mammalian cells, and may result in a glycosylated product which is not suitable for human therapeutic use.

30 Polypeptide Production

Host cells comprising a TSLPR polypeptide expression vector may be cultured using standard media well known to the skilled artisan. The media will usually contain all nutrients necessary for the growth and survival of the cells. Suitable media for culturing *E. coli* cells include, for example, Luria Broth (LB)

WO 02/00724

PCT/US01/20820

and/or Terrific Broth (TB). Suitable media for culturing eukaryotic cells include Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640), Minimal Essential Medium (MEM) and/or Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), all of which may be supplemented with serum and/or growth factors as necessary for the particular cell line being cultured. A suitable medium for insect cultures is Grace's medium supplemented with yeastolate, lactalbumin hydrolysate, and/or fetal calf serum as necessary.

Typically, an antibiotic or other compound useful for selective growth of transfected or transformed cells is added as a supplement to the media. The compound to be used will be dictated by the selectable marker element present on the plasmid with which the host cell was transformed. For example, where the selectable marker element is kanamycin resistance, the compound added to the culture medium will be kanamycin. Other compounds for selective growth include ampicillin, tetracycline, and neomycin.

The amount of a TSLPR polypeptide produced by a host cell can be evaluated using standard methods known in the art. Such methods include, without limitation, Western blot analysis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, non-denaturing gel electrophoresis, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) separation, immunoprecipitation, and/or activity assays such as DNA binding gel shift assays.

If a TSLPR polypeptide has been designed to be secreted from the host cells, the majority of polypeptide may be found in the cell culture medium. If however, the TSLPR polypeptide is not secreted from the host cells, it will be present in the cytoplasm and/or the nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for gram-negative bacteria host cells).

For a TSLPR polypeptide situated in the host cell cytoplasm and/or nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for bacterial host cells), the intracellular material (including inclusion bodies for gram-negative bacteria) can be extracted from the host cell using any standard technique known to the skilled artisan. For example, the host cells can be lysed to release the contents of the periplasm/cytoplasm by French press, homogenization, and/or sonication followed by centrifugation.

If a TSLPR polypeptide has formed inclusion bodies in the cytosol, the inclusion bodies can often bind to the inner and/or outer cellular membranes and thus will be found primarily in the pellet material after centrifugation. The pellet material

WO 02/00724

PCT/US01/20820

can then be treated at pH extremes or with a chaotropic agent such as a detergent, guanidine, guanidine derivatives, urea, or urea derivatives in the presence of a reducing agent such as dithiothreitol at alkaline pH or tris carboxyethyl phosphine at acid pH to release, break apart, and solubilize the inclusion bodies. The solubilized TSLPR polypeptide can then be analyzed using gel electrophoresis, immunoprecipitation, or the like. If it is desired to isolate the TSLPR polypeptide, isolation may be accomplished using standard methods such as those described herein and in Marston *et al.*, 1990, *Meth. Enz.*, 182:264-75.

10 In some cases, a TSLPR polypeptide may not be biologically active upon isolation. Various methods for "refolding" or converting the polypeptide to its tertiary structure and generating disulfide linkages can be used to restore biological activity. Such methods include exposing the solubilized polypeptide to a pH usually above 7 and in the presence of a particular concentration of a chaotrope. The selection of chaotrope is very similar to the choices used for inclusion body 15 solubilization, but usually the chaotrope is used at a lower concentration and is not necessarily the same as chaotropes used for the solubilization. In most cases the refolding/oxidation solution will also contain a reducing agent or the reducing agent plus its oxidized form in a specific ratio to generate a particular redox potential allowing for disulfide shuffling to occur in the formation of the protein's cysteine 20 bridges. Some of the commonly used redox couples include cysteine/cystamine, glutathione (GSH)/dithiois GSH, cupric chloride, dithiothreitol(DTT)/dithiane DTT, and 2-2-mercaptoethanol(bME)/dithio-b(ME). In many instances, a cosolvent may be used or may be needed to increase the efficiency of the refolding, and the more common reagents used for this purpose include glycerol, polyethylene glycol of 25 various molecular weights, arginine and the like.

If inclusion bodies are not formed to a significant degree upon expression of a TSLPR polypeptide, then the polypeptide will be found primarily in the supernatant after centrifugation of the cell homogenate. The polypeptide may be further isolated from the supernatant using methods such as those described herein.

30 The purification of a TSLPR polypeptide from solution can be accomplished using a variety of techniques. If the polypeptide has been synthesized such that it contains a tag such as Hexahistidine (TSLPR polypeptide/hexaHis) or other small peptide such as FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) or *myc* (Invitrogen) at either its carboxyl- or amino-terminus, it may be purified in a one-step process by

WO 02/00724

PCT/US01/20820

passing the solution through an affinity column where the column matrix has a high affinity for the tag.

For example, polyhistidine binds with great affinity and specificity to nickel. Thus, an affinity column of nickel (such as the Qiagen® nickel columns) can be used for purification of TSLPR polypeptide/polyHis. See, e.g., *Current Protocols in Molecular Biology* § 10.11.8 (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1993).

Additionally, TSLPR polypeptides may be purified through the use of a monoclonal antibody that is capable of specifically recognizing and binding to a TSLPR polypeptide.

Other suitable procedures for purification include, without limitation, affinity chromatography, immunoaffinity chromatography, ion exchange chromatography, molecular sieve chromatography, HPLC, electrophoresis (including native gel electrophoresis) followed by gel elution, and preparative isoelectric focusing ("Isoprime" machine/technique, Hoefer Scientific, San Francisco, CA). In some cases, two or more purification techniques may be combined to achieve increased purity.

TSLPR polypeptides may also be prepared by chemical synthesis methods (such as solid phase peptide synthesis) using techniques known in the art such as those set forth by Merrifield *et al.*, 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149; Houghten *et al.*, 1985, *Proc Natl Acad. Sci. USA* 82:5132; and Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Co. 1984). Such polypeptides may be synthesized with or without a methionine on the amino-terminus. Chemically synthesized TSLPR polypeptides may be oxidized using methods set forth in these references to form disulfide bridges. Chemically synthesized TSLPR polypeptides are expected to have comparable biological activity to the corresponding TSLPR polypeptides produced recombinantly or purified from natural sources, and thus may be used interchangeably with a recombinant or natural TSLPR polypeptide.

Another means of obtaining TSLPR polypeptide is via purification from biological samples such as source tissues and/or fluids in which the TSLPR polypeptide is naturally found. Such purification can be conducted using methods for protein purification as described herein. The presence of the TSLPR polypeptide during purification may be monitored, for example, using an antibody prepared against recombinantly produced TSLPR polypeptide or peptide fragments thereof.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

A number of additional methods for producing nucleic acids and polypeptides are known in the art, and the methods can be used to produce polypeptides having specificity for TSLPR polypeptide. See, e.g., Roberts *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12297-303, which describes the production of fusion proteins between an mRNA and its encoded peptide. See also, Roberts, 1999, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:268-73. Additionally, U.S. Patent No. 5,824,469 describes methods for obtaining oligonucleotides capable of carrying out a specific biological function. The procedure involves generating a heterogeneous pool of oligonucleotides, each having a 5' randomized sequence, a central preselected sequence, and a 3' randomized sequence. The resulting heterogeneous pool is introduced into a population of cells that do not exhibit the desired biological function. Subpopulations of the cells are then screened for those that exhibit a predetermined biological function. From that subpopulation, oligonucleotides capable of carrying out the desired biological function are isolated.

U.S. Patent Nos. 5,763,192; 5,814,476; 5,723,323; and 5,817,483 describe processes for producing peptides or polypeptides. This is done by producing stochastic genes or fragments thereof, and then introducing these genes into host cells which produce one or more proteins encoded by the stochastic genes. The host cells are then screened to identify those clones producing peptides or polypeptides having the desired activity.

Another method for producing peptides or polypeptides is described in PCT/US98/20094 (WO99/15650) filed by Athersys, Inc. Known as "Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery" (RAGE-GD), the process involves the activation of endogenous gene expression or over-expression of a gene by *in situ* recombination methods. For example, expression of an endogenous gene is activated or increased by integrating a regulatory sequence into the target cell which is capable of activating expression of the gene by non-homologous or illegitimate recombination. The target DNA is first subjected to radiation, and a genetic promoter inserted. The promoter eventually locates a break at the front of a gene, initiating transcription of the gene. This results in expression of the desired peptide or polypeptide.

It will be appreciated that these methods can also be used to create comprehensive TSLPR polypeptide expression libraries, which can subsequently be used for high throughput phenotypic screening in a variety of assays, such as

WO 02/00724

PCT/US01/20820

biochemical assays, cellular assays, and whole organism assays (*e.g.*, plant, mouse, etc.).

Synthesis

- 5 It will be appreciated by those skilled in the art that the nucleic acid and polypeptide molecules described herein may be produced by recombinant and other means.

Selective Binding Agents

- 10 The term "selective binding agent" refers to a molecule that has specificity for one or more TSLPR polypeptides. Suitable selective binding agents include, but are not limited to, antibodies and derivatives thereof, polypeptides, and small molecules. Suitable selective binding agents may be prepared using methods known in the art. An exemplary TSLPR polypeptide selective binding agent of the present invention is
15 capable of binding a certain portion of the TSLPR polypeptide thereby inhibiting the binding of the polypeptide to a TSLPR polypeptide receptor.

- Selective binding agents such as antibodies and antibody fragments that bind TSLPR polypeptides are within the scope of the present invention. The antibodies may be polyclonal including monospecific polyclonal; monoclonal (MAbs);
20 recombinant; chimeric; humanized, such as complementarity-determining region (CDR)-grafted; human; single chain; and/or bispecific; as well as fragments; variants; or derivatives thereof. Antibody fragments include those portions of the antibody that bind to an epitope on the TSLPR polypeptide. Examples of such fragments include Fab and F(ab') fragments generated by enzymatic cleavage of full-length antibodies.
25 Other binding fragments include those generated by recombinant DNA techniques, such as the expression of recombinant plasmids containing nucleic acid sequences encoding antibody variable regions.

- Polyclonal antibodies directed toward a TSLPR polypeptide generally are produced in animals (*e.g.*, rabbits or mice) by means of multiple subcutaneous or
30 intraperitoneal injections of TSLPR polypeptide and an adjuvant. It may be useful to conjugate a TSLPR polypeptide to a carrier protein that is immunogenic in the species to be immunized, such as keyhole limpet hemocyanin, serum, albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor. Also, aggregating agents such as

WO 02/00724

PCT/US01/20820

alum are used to enhance the immune response. After immunization, the animals are bled and the serum is assayed for anti-TSLPR antibody titer.

Monoclonal antibodies directed toward TSLPR polypeptides are produced using any method that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. Examples of suitable methods for preparing monoclonal antibodies include the hybridoma methods of Kohler *et al.*, 1975, *Nature* 256:495-97 and the human B-cell hybridoma method (Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133:3001; Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987). Also provided by the invention are hybridoma cell lines that produce monoclonal antibodies reactive with TSLPR polypeptides.

Monoclonal antibodies of the invention may be modified for use as therapeutics. One embodiment is a "chimeric" antibody in which a portion of the heavy (H) and/or light (L) chain is identical with or homologous to a corresponding sequence in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is/are identical with or homologous to a corresponding sequence in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass. Also included are fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity. See U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-55.

In another embodiment, a monoclonal antibody of the invention is a "humanized" antibody. Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art. See U.S. Patent Nos. 5,585,089 and 5,693,762. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source that is non-human. Humanization can be performed, for example, using methods described in the art (Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-25; Riechmann *et al.*, 1998, *Nature* 332:323-27; Verhoeven *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-36), by substituting at least a portion of a rodent complementarity-determining region for the corresponding regions of a human antibody.

Also encompassed by the invention are human antibodies that bind TSLPR polypeptides. Using transgenic animals (*e.g.*, mice) that are capable of producing a repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production such antibodies are produced by immunization with a TSLPR polypeptide antigen (*i.e.*, having at least 6 contiguous amino acids), optionally conjugated to a

WO 02/00724

PCT/US01/20820

carrier. See, e.g., Jakobovits *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:2551-55; Jakobovits *et al.*, 1993, *Nature* 362:255-58; Bruggermann *et al.*, 1993, *Year in Immunol.* 7:33. In one method, such transgenic animals are produced by incapacitating the endogenous loci encoding the heavy and light immunoglobulin chains therein, and inserting loci encoding human heavy and light chain proteins into the genome thereof. Partially modified animals, that is those having less than the full complement of modifications, are then cross-bred to obtain an animal having all of the desired immune system modifications. When administered an immunogen, these transgenic animals produce antibodies with human (rather than, e.g., murine) amino acid sequences, including variable regions which are immunospecific for these antigens. See PCT App. Nos. PCT/US96/05928 and PCT/US93/06926. Additional methods are described in U.S. Patent No. 5,545,807, PCT App. Nos. PCT/US91/245 and PCT/GB89/01207, and in European Patent Nos. 546073B1 and 546073A1. Human antibodies can also be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

In an alternative embodiment, human antibodies can also be produced from phage-display libraries (Hoogenboom *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581). These processes mimic immune selection through the display of antibody repertoires on the surface of filamentous bacteriophage, and subsequent selection of phage by their binding to an antigen of choice. One such technique is described in PCT App. No. PCT/US98/17364, which describes the isolation of high affinity and functional agonistic antibodies for MPL- and msk-receptors using such an approach.

Chimeric, CDR grafted, and humanized antibodies are typically produced by recombinant methods. Nucleic acids encoding the antibodies are introduced into host cells and expressed using materials and procedures described herein. In a preferred embodiment, the antibodies are produced in mammalian host cells, such as CHO cells. Monoclonal (e.g., human) antibodies may be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

The anti-TSLPR antibodies of the invention may be employed in any known assay method, such as competitive binding assays, direct and indirect sandwich assays, and immunoprecipitation assays (Sola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)) for the detection and quantitation of

WO 02/00724

PCT/US01/20820

TSLPR polypeptides. The antibodies will bind TSLPR polypeptides with an affinity that is appropriate for the assay method being employed.

For diagnostic applications, in certain embodiments, anti-TSLPR antibodies may be labeled with a detectable moiety. The detectable moiety can be any one that is capable of producing, either directly or indirectly, a detectable signal. For example, the detectable moiety may be a radioisotope, such as ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , or ^{67}Ga ; a fluorescent or chemiluminescent compound, such as fluorescein isothiocyanate, rhodamine, or luciferin; or an enzyme, such as alkaline phosphatase, β -galactosidase, or horseradish peroxidase (Bayer, *et al.*, 1990, *Meth. Enz.* 184:138-63).

Competitive binding assays rely on the ability of a labeled standard (*e.g.*, a TSLPR polypeptide, or an immunologically reactive portion thereof) to compete with the test sample analyte (an TSLPR polypeptide) for binding with a limited amount of anti-TSLPR antibody. The amount of a TSLPR polypeptide in the test sample is inversely proportional to the amount of standard that becomes bound to the antibodies. To facilitate determining the amount of standard that becomes bound, the antibodies typically are insolubilized before or after the competition, so that the standard and analyte that are bound to the antibodies may conveniently be separated from the standard and analyte which remain unbound.

Sandwich assays typically involve the use of two antibodies, each capable of binding to a different immunogenic portion, or epitope, of the protein to be detected and/or quantitated. In a sandwich assay, the test sample analyte is typically bound by a first antibody which is immobilized on a solid support, and thereafter a second antibody binds to the analyte, thus forming an insoluble three-part complex. *See, e.g.*, U.S. Patent No. 4,376,110. The second antibody may itself be labeled with a detectable moiety (direct sandwich assays) or may be measured using an anti-immunoglobulin antibody that is labeled with a detectable moiety (indirect sandwich assays). For example, one type of sandwich assay is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in which case the detectable moiety is an enzyme.

The selective binding agents, including anti-TSLPR antibodies, are also useful for *in vivo* imaging. An antibody labeled with a detectable moiety may be administered to an animal, preferably into the bloodstream, and the presence and location of the labeled antibody in the host assayed. The antibody may be labeled

WO 02/00724

PCT/US01/20820

with any moiety that is detectable in an animal, whether by nuclear magnetic resonance, radiology, or other detection means known in the art.

Selective binding agents of the invention, including antibodies, may be used as therapeutics. These therapeutic agents are generally agonists or antagonists, in that
5 they either enhance or reduce, respectively, at least one of the biological activities of a TSLPR polypeptide. In one embodiment, antagonist antibodies of the invention are antibodies or binding fragments thereof which are capable of specifically binding to a TSLPR polypeptide and which are capable of inhibiting or eliminating the functional activity of a TSLPR polypeptide *in vivo* or *in vitro*. In preferred embodiments, the
10 selective binding agent, *e.g.*, an antagonist antibody, will inhibit the functional activity of a TSLPR polypeptide by at least about 50%, and preferably by at least about 80%. In another embodiment, the selective binding agent may be an anti-TSLPR polypeptide antibody that is capable of interacting with a TSLPR polypeptide binding partner (a ligand or receptor) thereby inhibiting or eliminating TSLPR
15 polypeptide activity *in vitro* or *in vivo*. Selective binding agents, including agonist and antagonist anti-TSLPR polypeptide antibodies, are identified by screening assays that are well known in the art.

The invention also relates to a kit comprising TSLPR selective binding agents (such as antibodies) and other reagents useful for detecting TSLPR polypeptide levels
20 in biological samples. Such reagents may include a detectable label, blocking serum, positive and negative control samples, and detection reagents.

Microarrays

It will be appreciated that DNA microarray technology can be utilized in
25 accordance with the present invention. DNA microarrays are miniature, high-density arrays of nucleic acids positioned on a solid support, such as glass. Each cell or element within the array contains numerous copies of a single nucleic acid species that acts as a target for hybridization with a complementary nucleic acid sequence (*e.g.*, mRNA). In expression profiling using DNA microarray technology, mRNA is
30 first extracted from a cell or tissue sample and then converted enzymatically to fluorescently labeled cDNA. This material is hybridized to the microarray and unbound cDNA is removed by washing. The expression of discrete genes represented on the array is then visualized by quantitating the amount of labeled cDNA that is specifically bound to each target nucleic acid molecule. In this way, the expression of

WO 02/00724

PCT/US01/20820

thousands of genes can be quantitated in a high throughput, parallel manner from a single sample of biological material.

This high throughput expression profiling has a broad range of applications with respect to the TSLPR molecules of the invention, including, but not limited to:

5 the identification and validation of TSLPR disease-related genes as targets for therapeutics; molecular toxicology of related TSLPR molecules and inhibitors thereof; stratification of populations and generation of surrogate markers for clinical trials; and enhancing related TSLPR polypeptide small molecule drug discovery by aiding in the identification of selective compounds in high throughput screens.

10

Chemical Derivatives

Chemically modified derivatives of TSLPR polypeptides may be prepared by one skilled in the art, given the disclosures described herein. TSLPR polypeptide derivatives are modified in a manner that is different—either in the type or location of

15 the molecules naturally attached to the polypeptide. Derivatives may include molecules formed by the deletion of one or more naturally-attached chemical groups. The polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8, or other TSLPR polypeptide, may be modified by the covalent attachment of one or more polymers. For example, the polymer selected is

20 typically water-soluble so that the protein to which it is attached does not precipitate in an aqueous environment, such as a physiological environment. Included within the scope of suitable polymers is a mixture of polymers. Preferably, for therapeutic use of the end-product preparation, the polymer will be pharmaceutically acceptable.

The polymers each may be of any molecular weight and may be branched or

25 unbranched. The polymers each typically have an average molecular weight of between about 2 kDa to about 100 kDa (the term "about" indicating that in preparations of a water-soluble polymer, some molecules will weigh more, some less, than the stated molecular weight). The average molecular weight of each polymer is preferably between about 5 kDa and about 50 kDa, more preferably between about 12

30 kDa and about 40 kDa and most preferably between about 20 kDa and about 35 kDa.

Suitable water-soluble polymers or mixtures thereof include, but are not limited to, N-linked or O-linked carbohydrates, sugars, phosphates, polyethylene glycol (PEG) (including the forms of PEG that have been used to derivatize proteins, including mono-(C₁-C₁₀), alkoxy-, or aryloxy-polyethylene glycol), monomethoxy-

WO 02/00724

PCT/US01/20820

polyethylene glycol, dextran (such as low molecular weight dextran of, for example, about 6 kD), cellulose, or other carbohydrate based polymers, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols (e.g., glycerol), and polyvinyl alcohol. Also encompassed by the present invention are bifunctional crosslinking molecules which may be used to prepare covalently attached TSLPR polypeptide multimers.

In general, chemical derivatization may be performed under any suitable condition used to react a protein with an activated polymer molecule. Methods for preparing chemical derivatives of polypeptides will generally comprise the steps of: (a) reacting the polypeptide with the activated polymer molecule (such as a reactive ester or aldehyde derivative of the polymer molecule) under conditions whereby the polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, or SEQ ID NO: 8, or other TSLPR polypeptide, becomes attached to one or more polymer molecules, and (b) obtaining the reaction products. The optimal reaction conditions will be determined based on known parameters and the desired result. For example, the larger the ratio of polymer molecules to protein, the greater the percentage of attached polymer molecule. In one embodiment, the TSLPR polypeptide derivative may have a single polymer molecule moiety at the amino-terminus. See, e.g., U.S. Patent No. 5,234,784.

The pegylation of a polypeptide may be specifically carried out using any of the pegylation reactions known in the art. Such reactions are described, for example, in the following references: Francis *et al.*, 1992, *Focus on Growth Factors* 3:4-10; European Patent Nos. 0154316 and 0401384; and U.S. Patent No. 4,179,337. For example, pegylation may be carried out via an acylation reaction or an alkylation reaction with a reactive polyethylene glycol molecule (or an analogous reactive water-soluble polymer) as described herein. For the acylation reactions, a selected polymer should have a single reactive ester group. For reductive alkylation, a selected polymer should have a single reactive aldehyde group. A reactive aldehyde is, for example, polyethylene glycol propionaldehyde, which is water stable, or mono C₁-C₁₀ alkoxy or aryloxy derivatives thereof (see U.S. Patent No. 5,252,714).

In another embodiment, TSLPR polypeptides may be chemically coupled to biotin. The biotin/TSLPR polypeptide molecules are then allowed to bind to avidin, resulting in tetravalent avidin/biotin/TSLPR polypeptide molecules. TSLPR

WO 02/00724

PCT/US01/20820

polypeptides may also be covalently coupled to dinitrophenol (DNP) or trinitrophenol (TNP) and the resulting conjugates precipitated with anti-DNP or anti-TNP-IgM to form decameric conjugates with a valency of 10.

5 Generally, conditions that may be alleviated or modulated by the administration of the present TSLPR polypeptide derivatives include those described herein for TSLPR polypeptides. However, the TSLPR polypeptide derivatives disclosed herein may have additional activities, enhanced or reduced biological activity, or other characteristics, such as increased or decreased half-life, as compared to the non-derivatized molecules.

10

Genetically Engineered Non-Human Animals

Additionally included within the scope of the present invention are non-human animals such as mice, rats, or other rodents; rabbits, goats, sheep, or other farm animals, in which the genes encoding native TSLPR polypeptide have been
15 disrupted (*i.e.*, "knocked out") such that the level of expression of TSLPR polypeptide is significantly decreased or completely abolished. Such animals may be prepared using techniques and methods such as those described in U.S. Patent No. 5,557,032.

20 The present invention further includes non-human animals such as mice, rats, or other rodents; rabbits, goats, sheep, or other farm animals, in which either the native form of a TSLPR gene for that animal or a heterologous TSLPR gene is over-expressed by the animal, thereby creating a "transgenic" animal. Such transgenic animals may be prepared using well known methods such as those described in U.S. Patent No 5,489,743 and PCT Pub. No. WO 94/28122.

25 The present invention further includes non-human animals in which the promoter for one or more of the TSLPR polypeptides of the present invention is either activated or inactivated (*e.g.*, by using homologous recombination methods) to alter the level of expression of one or more of the native TSLPR polypeptides.

30 These non-human animals may be used for drug candidate screening. In such screening, the impact of a drug candidate on the animal may be measured. For example, drug candidates may decrease or increase the expression of the TSLPR gene. In certain embodiments, the amount of TSLPR polypeptide that is produced may be measured after the exposure of the animal to the drug candidate. Additionally, in certain embodiments, one may detect the actual impact of the drug

WO 02/00724

PCT/US01/20820

candidate on the animal. For example, over-expression of a particular gene may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease expression of the gene or its ability to prevent or inhibit a pathological condition. In other examples, the production of a particular metabolic product such as a fragment of a polypeptide, may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease the production of such a metabolic product or its ability to prevent or inhibit a pathological condition.

10 Assaying for Other Modulators of TSLPR Polypeptide Activity

In some situations, it may be desirable to identify molecules that are modulators, *i.e.*, agonists or antagonists, of the activity of TSLPR polypeptide. Natural or synthetic molecules that modulate TSLPR polypeptide may be identified using one or more screening assays, such as those described herein. Such molecules may be administered either in an *ex vivo* manner or in an *in vivo* manner by injection, or by oral delivery, implantation device, or the like.

"Test molecule" refers to a molecule that is under evaluation for the ability to modulate (*i.e.*, increase or decrease) the activity of a TSLPR polypeptide. Most commonly, a test molecule will interact directly with a TSLPR polypeptide.

20 However, it is also contemplated that a test molecule may also modulate TSLPR polypeptide activity indirectly, such as by affecting TSLPR gene expression, or by binding to a TSLPR polypeptide binding partner (*e.g.*, receptor or ligand). In one embodiment, a test molecule will bind to a TSLPR polypeptide with an affinity constant of at least about 10^{-6} M, preferably about 10^{-8} M, more preferably about 10^{-9} M, and even more preferably about 10^{-10} M.

25 Methods for identifying compounds that interact with TSLPR polypeptides are encompassed by the present invention. In certain embodiments, a TSLPR polypeptide is incubated with a test molecule under conditions that permit the interaction of the test molecule with a TSLPR polypeptide, and the extent of the interaction is measured. The test molecule can be screened in a substantially purified form or in a crude mixture.

30 In certain embodiments, a TSLPR polypeptide agonist or antagonist may be a protein, peptide, carbohydrate, lipid, or small molecular weight molecule that interacts with TSLPR polypeptide to regulate its activity. Molecules which regulate

WO 02/00724

PCT/US01/20820

TSLPR polypeptide expression include nucleic acids which are complementary to nucleic acids encoding a TSLPR polypeptide, or are complementary to nucleic acids sequences which direct or control the expression of TSLPR polypeptide, and which act as anti-sense regulators of expression.

5 Once a test molecule has been identified as interacting with a TSLPR polypeptide, the molecule may be further evaluated for its ability to increase or decrease TSLPR polypeptide activity. The measurement of the interaction of a test molecule with TSLPR polypeptide may be carried out in several formats, including cell-based binding assays, membrane binding assays, solution-phase assays, and
10 immunoassays. In general, a test molecule is incubated with a TSLPR polypeptide for a specified period of time, and TSLPR polypeptide activity is determined by one or more assays for measuring biological activity.

The interaction of test molecules with TSLPR polypeptides may also be assayed directly using polyclonal or monoclonal antibodies in an immunoassay.
15 Alternatively, modified forms of TSLPR polypeptides containing epitope tags as described herein may be used in solution and immunoassays.

In the event that TSLPR polypeptides display biological activity through an interaction with a binding partner (*e.g.*, a receptor or a ligand), a variety of *in vitro* assays may be used to measure the binding of a TSLPR polypeptide to the
20 corresponding binding partner (such as a selective binding agent, receptor, or ligand). These assays may be used to screen test molecules for their ability to increase or decrease the rate and/or the extent of binding of a TSLPR polypeptide to its binding partner. In one assay, a TSLPR polypeptide is immobilized in the wells of a microtiter plate. Radiolabeled TSLPR polypeptide binding partner (for example,
25 iodinated TSLPR polypeptide binding partner) and a test molecule can then be added either one at a time (in either order) or simultaneously to the wells. After incubation, the wells can be washed and counted for radioactivity, using a scintillation counter, to determine the extent to which the binding partner bound to the TSLPR polypeptide. Typically, a molecule will be tested over a range of concentrations, and a series of
30 control wells lacking one or more elements of the test assays can be used for accuracy in the evaluation of the results. An alternative to this method involves reversing the "positions" of the proteins, *i.e.*, immobilizing TSLPR polypeptide binding partner to the microtiter plate wells, incubating with the test molecule and radiolabeled TSLPR polypeptide, and determining the extent of TSLPR polypeptide binding. *See, e.g.*,

WO 02/00724

PCT/US01/20820

Current Protocols in Molecular Biology, chap. 18 (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1995).

As an alternative to radiolabeling, a TSLPR polypeptide or its binding partner may be conjugated to biotin, and the presence of biotinylated protein can then be
5 detected using streptavidin linked to an enzyme, such as horse radish peroxidase (HRP) or alkaline phosphatase (AP), which can be detected colorometrically, or by fluorescent tagging of streptavidin. An antibody directed to a TSLPR polypeptide or to a TSLPR polypeptide binding partner, and which is conjugated to biotin, may also be used for purposes of detection following incubation of the complex with enzyme-
10 linked streptavidin linked to AP or HRP.

A TSLPR polypeptide or a TSLPR polypeptide binding partner can also be immobilized by attachment to agarose beads, acrylic beads, or other types of such inert solid phase substrates. The substrate-protein complex can be placed in a solution containing the complementary protein and the test compound. After
15 incubation, the beads can be precipitated by centrifugation, and the amount of binding between a TSLPR polypeptide and its binding partner can be assessed using the methods described herein. Alternatively, the substrate-protein complex can be immobilized in a column with the test molecule and complementary protein passing through the column. The formation of a complex between a TSLPR polypeptide and
20 its binding partner can then be assessed using any of the techniques described herein (*e.g.*, radiolabelling or antibody binding).

Another *in vitro* assay that is useful for identifying a test molecule that increases or decreases the formation of a complex between a TSLPR polypeptide binding protein and a TSLPR polypeptide binding partner is a surface plasmon
25 resonance detector system such as the BIAcore assay system (Pharmacia, Piscataway, NJ). The BIAcore system is utilized as specified by the manufacturer. This assay essentially involves the covalent binding of either TSLPR polypeptide or a TSLPR polypeptide binding partner to a dextran-coated sensor chip that is located in a detector. The test compound and the other complementary protein can then be
30 injected, either simultaneously or sequentially, into the chamber containing the sensor chip. The amount of complementary protein that binds can be assessed based on the change in molecular mass that is physically associated with the dextran-coated side of the sensor chip, with the change in molecular mass being measured by the detector system.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

In some cases, it may be desirable to evaluate two or more test compounds together for their ability to increase or decrease the formation of a complex between a TSLPR polypeptide and a TSLPR polypeptide binding partner. In these cases, the assays set forth herein can be readily modified by adding such additional test compound(s) either simultaneously with, or subsequent to, the first test compound. The remainder of the steps in the assay are as set forth herein.

In vitro assays such as those described herein may be used advantageously to screen large numbers of compounds for an effect on the formation of a complex between a TSLPR polypeptide and TSLPR polypeptide binding partner. The assays may be automated to screen compounds generated in phage display, synthetic peptide, and chemical synthesis libraries.

Compounds which increase or decrease the formation of a complex between a TSLPR polypeptide and a TSLPR polypeptide binding partner may also be screened in cell culture using cells and cell lines expressing either TSLPR polypeptide or TSLPR polypeptide binding partner. Cells and cell lines may be obtained from any mammal, but preferably will be from human or other primate, canine, or rodent sources. The binding of a TSLPR polypeptide to cells expressing TSLPR polypeptide binding partner at the surface is evaluated in the presence or absence of test molecules, and the extent of binding may be determined by, for example, flow cytometry using a biotinylated antibody to a TSLPR polypeptide binding partner. Cell culture assays can be used advantageously to further evaluate compounds that score positive in protein binding assays described herein.

Cell cultures can also be used to screen the impact of a drug candidate. For example, drug candidates may decrease or increase the expression of the TSLPR gene. In certain embodiments, the amount of TSLPR polypeptide or a TSLPR polypeptide fragment that is produced may be measured after exposure of the cell culture to the drug candidate. In certain embodiments, one may detect the actual impact of the drug candidate on the cell culture. For example, the over-expression of a particular gene may have a particular impact on the cell culture. In such cases, one may test a drug candidate's ability to increase or decrease the expression of the gene or its ability to prevent or inhibit a particular impact on the cell culture. In other examples, the production of a particular metabolic product such as a fragment of a polypeptide, may result in, or be associated with, a disease or pathological condition.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease the production of such a metabolic product in a cell culture.

Internalizing Proteins

5 The *tat* protein sequence (from HIV) can be used to internalize proteins into a cell. See, e.g., Falwell *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:664-68. For example, an 11 amino acid sequence (Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEQ ID NO: 13) of the HIV *tat* protein (termed the "protein transduction domain," or TAT PDT) has been described as mediating delivery across the cytoplasmic membrane and the nuclear
10 membrane of a cell. See Schwatze *et al.*, 1999, *Science* 285:1569-72; and Nagahara *et al.*, 1998, *Nat. Med.* 4:1449-52. In these procedures, FITC-constructs (FITC-labeled G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEQ ID NO: 14), which penetrate tissues following intraperitoneal administration, are prepared, and the binding of such constructs to cells is detected by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis.
15 Cells treated with a *tat*- β -gal fusion protein will demonstrate β -gal activity. Following injection, expression of such a construct can be detected in a number of tissues, including liver, kidney, lung, heart, and brain tissue. It is believed that such constructs undergo some degree of unfolding in order to enter the cell, and as such, may require a refolding following entry into the cell.

20 It will thus be appreciated that the *tat* protein sequence may be used to internalize a desired polypeptide into a cell. For example, using the *tat* protein sequence, a TSLPR antagonist (such as an anti-TSLPR selective binding agent, small molecule, soluble receptor, or antisense oligonucleotide) can be administered intracellularly to inhibit the activity of a TSLPR molecule. As used herein, the term
25 "TSLPR molecule" refers to both TSLPR nucleic acid molecules and TSLPR polypeptides as defined herein. Where desired, the TSLPR protein itself may also be internally administered to a cell using these procedures. See also, Straus, 1999, *Science* 285:1466-67.

30 Cell Source Identification Using TSLPR Polypeptide

In accordance with certain embodiments of the invention, it may be useful to be able to determine the source of a certain cell type associated with a TSLPR polypeptide. For example, it may be useful to determine the origin of a disease or pathological condition as an aid in selecting an appropriate therapy. In certain

WO 02/00724

PCT/US01/20820

embodiments, nucleic acids encoding a TSLPR polypeptide can be used as a probe to identify cells described herein by screening the nucleic acids of the cells with such a probe. In other embodiments, one may use anti-TSLPR polypeptide antibodies to test for the presence of TSLPR polypeptide in cells, and thus, determine if such cells are of the types described herein.

TSLPR Polypeptide Compositions and Administration

Therapeutic compositions are within the scope of the present invention. Such TSLPR polypeptide pharmaceutical compositions may comprise a therapeutically effective amount of a TSLPR polypeptide or a TSLPR nucleic acid molecule in admixture with a pharmaceutically or physiologically acceptable formulation agent selected for suitability with the mode of administration. Pharmaceutical compositions may comprise a therapeutically effective amount of one or more TSLPR polypeptide selective binding agents in admixture with a pharmaceutically or physiologically acceptable formulation agent selected for suitability with the mode of administration.

Acceptable formulation materials preferably are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed.

The pharmaceutical composition may contain formulation materials for modifying, maintaining, or preserving, for example, the pH, osmolality, viscosity, clarity, color, isotonicity, odor, sterility, stability, rate of dissolution or release, adsorption, or penetration of the composition. Suitable formulation materials include, but are not limited to, amino acids (such as glycine, glutamine, asparagine, arginine, or lysine), antimicrobials, antioxidants (such as ascorbic acid, sodium sulfite, or sodium hydrogen-sulfite), buffers (such as borate, bicarbonate, Tris-HCl, citrates, phosphates, or other organic acids), bulking agents (such as mannitol or glycine), chelating agents (such as ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)), complexing agents (such as caffeine, polyvinylpyrrolidone, beta-cyclodextrin, or hydroxypropyl-beta-cyclodextrin), fillers, monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates (such as glucose, mannose, or dextrans), proteins (such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins), coloring, flavoring and diluting agents, emulsifying agents, hydrophilic polymers (such as polyvinylpyrrolidone), low molecular weight polypeptides, salt-forming counterions (such as sodium), preservatives (such as benzalkonium chloride, benzoic acid, salicylic acid, thimerosal, phenethyl alcohol, methylparaben, propylparaben, chlorhexidine, sorbic acid, or hydrogen peroxide),

WO 02/00724

PCT/US01/20820

solvents (such as glycerin, propylene glycol, or polyethylene glycol), sugar alcohols (such as mannitol or sorbitol), suspending agents, surfactants or wetting agents (such as pluronics; PEG; sorbitan esters; polysorbates such as polysorbate 20 or polysorbate 80; triton; tromethamine; lecithin; cholesterol or tyloxapal), stability enhancing agents (such as sucrose or sorbitol), tonicity enhancing agents (such as alkali metal halides – preferably sodium or potassium chloride – or mannitol sorbitol), delivery vehicles, diluents, excipients and/or pharmaceutical adjuvants. See *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18th Ed., A.R. Genmaro, ed., Mack Publishing Company 1990).

10 The optimal pharmaceutical composition will be determined by a skilled artisan depending upon, for example, the intended route of administration, delivery format, and desired dosage. See, e.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*. Such compositions may influence the physical state, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance of the TSLPR molecule.

15 The primary vehicle or carrier in a pharmaceutical composition may be either aqueous or non-aqueous in nature. For example, a suitable vehicle or carrier for injection may be water, physiological saline solution, or artificial cerebrospinal fluid, possibly supplemented with other materials common in compositions for parenteral administration. Neutral buffered saline or saline mixed with serum albumin are further exemplary vehicles. Other exemplary pharmaceutical compositions comprise 20 Tris buffer of about pH 7.0-8.5, or acetate buffer of about pH 4.0-5.5, which may further include sorbitol or a suitable substitute. In one embodiment of the present invention, TSLPR polypeptide compositions may be prepared for storage by mixing the selected composition having the desired degree of purity with optional 25 formulation agents (*Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*) in the form of a lyophilized cake or an aqueous solution. Further, the TSLPR polypeptide product may be formulated as a lyophilizate using appropriate excipients such as sucrose.

The TSLPR polypeptide pharmaceutical compositions can be selected for parenteral delivery. Alternatively, the compositions may be selected for inhalation or 30 for delivery through the digestive tract, such as orally. The preparation of such pharmaceutically acceptable compositions is within the skill of the art.

The formulation components are present in concentrations that are acceptable to the site of administration. For example, buffers are used to maintain the composition at physiological pH or at a slightly lower pH, typically within a pH range

WO 02/00724

PCT/US01/20820

of from about 5 to about 8.

When parenteral administration is contemplated, the therapeutic compositions for use in this invention may be in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable, aqueous solution comprising the desired TSLPR molecule in a pharmaceutically acceptable vehicle. A particularly suitable vehicle for parenteral injection is sterile distilled water in which a TSLPR molecule is formulated as a sterile, isotonic solution, properly preserved. Yet another preparation can involve the formulation of the desired molecule with an agent, such as injectable microspheres, bio-erodible particles, polymeric compounds (such as polylactic acid or polyglycolic acid), beads, or liposomes, that provides for the controlled or sustained release of the product which may then be delivered via a depot injection. Hyaluronic acid may also be used, and this may have the effect of promoting sustained duration in the circulation. Other suitable means for the introduction of the desired molecule include implantable drug delivery devices.

In one embodiment, a pharmaceutical composition may be formulated for inhalation. For example, TSLPR polypeptide may be formulated as a dry powder for inhalation. TSLPR polypeptide or nucleic acid molecule inhalation solutions may also be formulated with a propellant for aerosol delivery. In yet another embodiment, solutions may be nebulized. Pulmonary administration is further described in PCT Pub. No. WO 94/20069, which describes the pulmonary delivery of chemically modified proteins.

It is also contemplated that certain formulations may be administered orally. In one embodiment of the present invention, TSLPR polypeptides that are administered in this fashion can be formulated with or without those carriers customarily used in the compounding of solid dosage forms such as tablets and capsules. For example, a capsule may be designed to release the active portion of the formulation at the point in the gastrointestinal tract when bioavailability is maximized and pre-systemic degradation is minimized. Additional agents can be included to facilitate absorption of the TSLPR polypeptide. Diluents, flavorings, low melting point waxes, vegetable oils, lubricants, suspending agents, tablet disintegrating agents, and binders may also be employed.

Another pharmaceutical composition may involve an effective quantity of TSLPR polypeptides in a mixture with non-toxic excipients that are suitable for the manufacture of tablets. By dissolving the tablets in sterile water, or another

WO 02/00724

PCT/US01/20820

appropriate vehicle, solutions can be prepared in unit-dose form. Suitable excipients include, but are not limited to, inert diluents, such as calcium carbonate, sodium carbonate or bicarbonate, lactose, or calcium phosphate; or binding agents, such as starch, gelatin, or acacia; or lubricating agents such as magnesium stearate, stearic acid, or talc.

Additional TSLPR polypeptide pharmaceutical compositions will be evident to those skilled in the art, including formulations involving TSLPR polypeptides in sustained- or controlled-delivery formulations. Techniques for formulating a variety of other sustained- or controlled-delivery means, such as liposome carriers, bi-erodible microparticles or porous beads and depot injections, are also known to those skilled in the art. *See, e.g.*, PCT/US93/00829, which describes the controlled release of porous polymeric microparticles for the delivery of pharmaceutical compositions.

Additional examples of sustained-release preparations include semipermeable polymer matrices in the form of shaped articles, *e.g.* films, or microcapsules. Sustained release matrices may include polyesters, hydrogels, polylactides (U.S. Patent No. 3,773,919 and European Patent No. 058481), copolymers of L-glutamic acid and gamma ethyl-L-glutamate (Sidman *et al.*, 1983, *Biopolymers* 22:547-56), poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) (Langer *et al.*, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 and Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), ethylene vinyl acetate (Langer *et al.*, *supra*) or poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid (European Patent No. 133988). Sustained-release compositions may also include liposomes, which can be prepared by any of several methods known in the art. *See, e.g.*, Epstein *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-92; and European Patent Nos. 036676, 088046, and 143949.

The TSLPR pharmaceutical composition to be used for *in vivo* administration typically must be sterile. This may be accomplished by filtration through sterile filtration membranes. Where the composition is lyophilized, sterilization using this method may be conducted either prior to, or following, lyophilization and reconstitution. The composition for parenteral administration may be stored in lyophilized form or in a solution. In addition, parenteral compositions generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

Once the pharmaceutical composition has been formulated, it may be stored in sterile vials as a solution, suspension, gel, emulsion, solid, or as a dehydrated or

WO 02/00724

PCT/US01/20820

lyophilized powder. Such formulations may be stored either in a ready-to-use form or in a form (*e.g.*, lyophilized) requiring reconstitution prior to administration.

In a specific embodiment, the present invention is directed to kits for producing a single-dose administration unit. The kits may each contain both a first
5 container having a dried protein and a second container having an aqueous formulation. Also included within the scope of this invention are kits containing single and multi-chambered pre-filled syringes (*e.g.*, liquid syringes and lysosyringes).

The effective amount of a TSLPR pharmaceutical composition to be employed therapeutically will depend, for example, upon the therapeutic context and objectives.
10 One skilled in the art will appreciate that the appropriate dosage levels for treatment will thus vary depending, in part, upon the molecule delivered, the indication for which the TSLPR molecule is being used, the route of administration, and the size (body weight, body surface, or organ size) and condition (the age and general health) of the patient. Accordingly, the clinician may titer the dosage and modify the route of
15 administration to obtain the optimal therapeutic effect. A typical dosage may range from about 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to up to about 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. In other embodiments, the dosage may range from 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ up to about 100 mg/kg ; or 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ up to about 100 mg/kg ; or 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ up to about 100 mg/kg .

20 The frequency of dosing will depend upon the pharmacokinetic parameters of the TSLPR molecule in the formulation being used. Typically, a clinician will administer the composition until a dosage is reached that achieves the desired effect. The composition may therefore be administered as a single dose, as two or more doses (which may or may not contain the same amount of the desired molecule) over
25 time, or as a continuous infusion via an implantation device or catheter. Further refinement of the appropriate dosage is routinely made by those of ordinary skill in the art and is within the ambit of tasks routinely performed by them. Appropriate dosages may be ascertained through use of appropriate dose-response data.

The route of administration of the pharmaceutical composition is in accord
30 with known methods, *e.g.*, orally; through injection by intravenous, intraperitoneal, intracerebral (intraparenchymal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, or intralesional routes; by sustained release systems; or by implantation devices. Where desired, the compositions may be administered by bolus injection or continuously by infusion, or by implantation device.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

Alternatively or additionally, the composition may be administered locally via implantation of a membrane, sponge, or other appropriate material onto which the desired molecule has been absorbed or encapsulated. Where an implantation device is used, the device may be implanted into any suitable tissue or organ, and delivery of
5 the desired molecule may be via diffusion, timed-release bolus, or continuous administration.

In some cases, it may be desirable to use TSLPR polypeptide pharmaceutical compositions in an *ex vivo* manner. In such instances, cells, tissues, or organs that have been removed from the patient are exposed to TSLPR polypeptide
10 pharmaceutical compositions after which the cells, tissues, or organs are subsequently implanted back into the patient.

In other cases, a TSLPR polypeptide can be delivered by implanting certain cells that have been genetically engineered, using methods such as those described herein, to express and secrete the TSLPR polypeptide. Such cells may be animal or
15 human cells, and may be autologous, heterologous, or xenogenic. Optionally, the cells may be immortalized. In order to decrease the chance of an immunological response, the cells may be encapsulated to avoid infiltration of surrounding tissues. The encapsulation materials are typically biocompatible, semi-permeable polymeric enclosures or membranes that allow the release of the protein product(s) but prevent
20 the destruction of the cells by the patient's immune system or by other detrimental factors from the surrounding tissues.

As discussed herein, it may be desirable to treat isolated cell populations (such as stem cells, lymphocytes, red blood cells, chondrocytes, neurons, and the like) with one or more TSLPR polypeptides. This can be accomplished by exposing the isolated
25 cells to the polypeptide directly, where it is in a form that is permeable to the cell membrane.

Additional embodiments of the present invention relate to cells and methods (e.g., homologous recombination and/or other recombinant production methods) for both the *in vitro* production of therapeutic polypeptides and for the production and
30 delivery of therapeutic polypeptides by gene therapy or cell therapy. Homologous and other recombination methods may be used to modify a cell that contains a normally transcriptionally-silent TSLPR gene, or an under-expressed gene, and thereby produce a cell which expresses therapeutically efficacious amounts of TSLPR polypeptides.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

Homologous recombination is a technique originally developed for targeting genes to induce or correct mutations in transcriptionally active genes. Kucherlapati, 1989, *Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol.* 36:301. The basic technique was developed as a method for introducing specific mutations into specific regions of the mammalian genome (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) or to correct specific mutations within defective genes (Doetschman *et al.*, 1987, *Nature* 330:576-78). Exemplary homologous recombination techniques are described in U.S. Patent No. 5,272,071; European Patent Nos. 9193051 and 505500; PCT/US90/07642, and PCT Pub No. WO 91/09955).

Through homologous recombination, the DNA sequence to be inserted into the genome can be directed to a specific region of the gene of interest by attaching it to targeting DNA. The targeting DNA is a nucleotide sequence that is complementary (homologous) to a region of the genomic DNA. Small pieces of targeting DNA that are complementary to a specific region of the genome are put in contact with the parental strand during the DNA replication process. It is a general property of DNA that has been inserted into a cell to hybridize, and therefore, recombine with other pieces of endogenous DNA through shared homologous regions. If this complementary strand is attached to an oligonucleotide that contains a mutation or a different sequence or an additional nucleotide, it too is incorporated into the newly synthesized strand as a result of the recombination. As a result of the proofreading function, it is possible for the new sequence of DNA to serve as the template. Thus, the transferred DNA is incorporated into the genome.

Attached to these pieces of targeting DNA are regions of DNA that may interact with or control the expression of a TSLPR polypeptide, *e.g.*, flanking sequences. For example, a promoter/enhancer element, a suppressor, or an exogenous transcription modulatory element is inserted in the genome of the intended host cell in proximity and orientation sufficient to influence the transcription of DNA encoding the desired TSLPR polypeptide. The control element controls a portion of the DNA present in the host cell genome. Thus, the expression of the desired TSLPR polypeptide may be achieved not by transfection of DNA that encodes the TSLPR gene itself, but rather by the use of targeting DNA (containing regions of homology with the endogenous gene of interest) coupled with DNA regulatory segments that

WO 02/00724

PCT/US01/20820

provide the endogenous gene sequence with recognizable signals for transcription of a TSLPR gene.

In an exemplary method, the expression of a desired targeted gene in a cell (*i.e.*, a desired endogenous cellular gene) is altered via homologous recombination into the cellular genome at a preselected site, by the introduction of DNA which includes at least a regulatory sequence, an exon, and a splice donor site. These components are introduced into the chromosomal (genomic) DNA in such a manner that this, in effect, results in the production of a new transcription unit (in which the regulatory sequence, the exon, and the splice donor site present in the DNA construct are operatively linked to the endogenous gene). As a result of the introduction of these components into the chromosomal DNA, the expression of the desired endogenous gene is altered.

Altered gene expression, as described herein, encompasses activating (or causing to be expressed) a gene which is normally silent (unexpressed) in the cell as obtained, as well as increasing the expression of a gene which is not expressed at physiologically significant levels in the cell as obtained. The embodiments further encompass changing the pattern of regulation or induction such that it is different from the pattern of regulation or induction that occurs in the cell as obtained, and reducing (including eliminating) the expression of a gene which is expressed in the cell as obtained.

One method by which homologous recombination can be used to increase, or cause, TSLPR polypeptide production from a cell's endogenous TSLPR gene involves first using homologous recombination to place a recombination sequence from a site-specific recombination system (*e.g.*, Cre/loxP, FLP/FRT) (Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5:521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225:890-900) upstream of (*i.e.*, 5' to) the cell's endogenous genomic TSLPR polypeptide coding region. A plasmid containing a recombination site homologous to the site that was placed just upstream of the genomic TSLPR polypeptide coding region is introduced into the modified cell line along with the appropriate recombinase enzyme. This recombinase causes the plasmid to integrate, via the plasmid's recombination site, into the recombination site located just upstream of the genomic TSLPR polypeptide coding region in the cell line (Baubonis and Sauer, 1993, *Nucleic Acids Res.* 21:2025-29; O'Gorman *et al.*, 1991, *Science* 251:1351-55). Any flanking sequences known to increase transcription (*e.g.*, enhancer/promoter, intron, translational enhancer), if

WO 02/00724

PCT/US01/20820

properly positioned in this plasmid, would integrate in such a manner as to create a new or modified transcriptional unit resulting in *de novo* or increased TSLPR polypeptide production from the cell's endogenous TSLPR gene.

5 A further method to use the cell line in which the site specific recombination sequence had been placed just upstream of the cell's endogenous genomic TSLPR polypeptide coding region is to use homologous recombination to introduce a second recombination site elsewhere in the cell line's genome. The appropriate recombinase enzyme is then introduced into the two-recombination-site cell line, causing a recombination event (deletion, inversion, and translocation) (Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5:521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225:890-900) that would
10 create a new or modified transcriptional unit resulting in *de novo* or increased TSLPR polypeptide production from the cell's endogenous TSLPR gene.

An additional approach for increasing, or causing, the expression of TSLPR polypeptide from a cell's endogenous TSLPR gene involves increasing, or causing,
15 the expression of a gene or genes (*e.g.*, transcription factors) and/or decreasing the expression of a gene or genes (*e.g.*, transcriptional repressors) in a manner which results in *de novo* or increased TSLPR polypeptide production from the cell's endogenous TSLPR gene. This method includes the introduction of a non-naturally occurring polypeptide (*e.g.*, a polypeptide comprising a site specific DNA binding
20 domain fused to a transcriptional factor domain) into the cell such that *de novo* or increased TSLPR polypeptide production from the cell's endogenous TSLPR gene results.

The present invention further relates to DNA constructs useful in the method of altering expression of a target gene. In certain embodiments, the exemplary DNA
25 constructs comprise: (a) one or more targeting sequences, (b) a regulatory sequence, (c) an exon, and (d) an unpaired splice-donor site. The targeting sequence in the DNA construct directs the integration of elements (a) - (d) into a target gene in a cell such that the elements (b) - (d) are operatively linked to sequences of the endogenous target gene. In another embodiment, the DNA constructs comprise: (a) one or more
30 targeting sequences, (b) a regulatory sequence, (c) an exon, (d) a splice-donor site, (e) an intron, and (f) a splice-acceptor site, wherein the targeting sequence directs the integration of elements (a) - (f) such that the elements of (b) - (f) are operatively linked to the endogenous gene. The targeting sequence is homologous to the preselected site in the cellular chromosomal DNA with which homologous

WO 02/00724

PCT/US01/20820

recombination is to occur. In the construct, the exon is generally 3' of the regulatory sequence and the splice-donor site is 3' of the exon.

If the sequence of a particular gene is known, such as the nucleic acid sequence of TSLPR polypeptide presented herein, a piece of DNA that is complementary to a selected region of the gene can be synthesized or otherwise obtained, such as by appropriate restriction of the native DNA at specific recognition sites bounding the region of interest. This piece serves as a targeting sequence upon insertion into the cell and will hybridize to its homologous region within the genome. If this hybridization occurs during DNA replication, this piece of DNA, and any additional sequence attached thereto, will act as an Okazaki fragment and will be incorporated into the newly synthesized daughter strand of DNA. The present invention, therefore, includes nucleotides encoding a TSLPR polypeptide, which nucleotides may be used as targeting sequences.

TSLPR polypeptide cell therapy, *e.g.*, the implantation of cells producing TSLPR polypeptides, is also contemplated. This embodiment involves implanting cells capable of synthesizing and secreting a biologically active form of TSLPR polypeptide. Such TSLPR polypeptide-producing cells can be cells that are natural producers of TSLPR polypeptides or may be recombinant cells whose ability to produce TSLPR polypeptides has been augmented by transformation with a gene encoding the desired TSLPR polypeptide or with a gene augmenting the expression of TSLPR polypeptide. Such a modification may be accomplished by means of a vector suitable for delivering the gene as well as promoting its expression and secretion. In order to minimize a potential immunological reaction in patients being administered a TSLPR polypeptide, as may occur with the administration of a polypeptide of a foreign species, it is preferred that the natural cells producing TSLPR polypeptide be of human origin and produce human TSLPR polypeptide. Likewise, it is preferred that the recombinant cells producing TSLPR polypeptide be transformed with an expression vector containing a gene encoding a human TSLPR polypeptide.

Implanted cells may be encapsulated to avoid the infiltration of surrounding tissue. Human or non-human animal cells may be implanted in patients in biocompatible, semipermeable polymeric enclosures or membranes that allow the release of TSLPR polypeptide, but that prevent the destruction of the cells by the patient's immune system or by other detrimental factors from the surrounding tissue.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

Alternatively, the patient's own cells, transformed to produce TSLPR polypeptides *ex vivo*, may be implanted directly into the patient without such encapsulation.

Techniques for the encapsulation of living cells are known in the art, and the preparation of the encapsulated cells and their implantation in patients may be routinely accomplished. For example, Baetge *et al.* (PCT Pub. No. WO 95/05452 and PCT/US94/09299) describe membrane capsules containing genetically engineered cells for the effective delivery of biologically active molecules. The capsules are biocompatible and are easily retrievable. The capsules encapsulate cells transfected with recombinant DNA molecules comprising DNA sequences coding for biologically active molecules operatively linked to promoters that are not subject to down-regulation *in vivo* upon implantation into a mammalian host. The devices provide for the delivery of the molecules from living cells to specific sites within a recipient. In addition, *see* U.S. Patent Nos. 4,892,538; 5,011,472; and 5,106,627. A system for encapsulating living cells is described in PCT Pub. No. WO 91/10425 (Aebischer *et al.*). *See also*, PCT Pub. No. WO 91/10470 (Aebischer *et al.*); Winn *et al.*, 1991, *Exper. Neurol.* 113:322-29; Aebischer *et al.*, 1991, *Exper. Neurol.* 111:269-75; and Tresco *et al.*, 1992, *ASAIO* 38:17-23.

In vivo and *in vitro* gene therapy delivery of TSLPR polypeptides is also envisioned. One example of a gene therapy technique is to use the TSLPR gene (either genomic DNA, cDNA, and/or synthetic DNA) encoding a TSLPR polypeptide which may be operably linked to a constitutive or inducible promoter to form a "gene therapy DNA construct." The promoter may be homologous or heterologous to the endogenous TSLPR gene, provided that it is active in the cell or tissue type into which the construct will be inserted. Other components of the gene therapy DNA construct may optionally include DNA molecules designed for site-specific integration (*e.g.*, endogenous sequences useful for homologous recombination), tissue-specific promoters, enhancers or silencers, DNA molecules capable of providing a selective advantage over the parent cell, DNA molecules useful as labels to identify transformed cells, negative selection systems, cell specific binding agents (as, for example, for cell targeting), cell-specific internalization factors, transcription factors enhancing expression from a vector, and factors enabling vector production.

A gene therapy DNA construct can then be introduced into cells (either *ex vivo* or *in vivo*) using viral or non-viral vectors. One means for introducing the gene therapy DNA construct is by means of viral vectors as described herein. Certain

WO 02/00724

PCT/US01/20820

vectors, such as retroviral vectors, will deliver the DNA construct to the chromosomal DNA of the cells, and the gene can integrate into the chromosomal DNA. Other vectors will function as episomes, and the gene therapy DNA construct will remain in the cytoplasm.

5 In yet other embodiments, regulatory elements can be included for the controlled expression of the TSLPR gene in the target cell. Such elements are turned on in response to an appropriate effector. In this way, a therapeutic polypeptide can be expressed when desired. One conventional control means involves the use of small molecule dimerizers or rapalogs to dimerize chimeric proteins which contain a
10 small molecule-binding domain and a domain capable of initiating a biological process, such as a DNA-binding protein or transcriptional activation protein (*see* PCT Pub. Nos. WO 96/41865, WO 97/31898, and WO 97/31899). The dimerization of the proteins can be used to initiate transcription of the transgene.

An alternative regulation technology uses a method of storing proteins
15 expressed from the gene of interest inside the cell as an aggregate or cluster. The gene of interest is expressed as a fusion protein that includes a conditional aggregation domain that results in the retention of the aggregated protein in the endoplasmic reticulum. The stored proteins are stable and inactive inside the cell. The proteins can be released, however, by administering a drug (*e.g.*, small molecule
20 ligand) that removes the conditional aggregation domain and thereby specifically breaks apart the aggregates or clusters so that the proteins may be secreted from the cell. *See* Aridor *et al.*, 2000, *Science* 287:816-17 and Rivera *et al.*, 2000, *Science* 287:826-30.

Other suitable control means or gene switches include, but are not limited to,
25 the systems described herein. Mifepristone (RU486) is used as a progesterone antagonist. The binding of a modified progesterone receptor ligand-binding domain to the progesterone antagonist activates transcription by forming a dimer of two transcription factors that then pass into the nucleus to bind DNA. The ligand-binding domain is modified to eliminate the ability of the receptor to bind to the natural
30 ligand. The modified steroid hormone receptor system is further described in U.S. Patent No. 5,364,791 and PCT Pub. Nos. WO 96/40911 and WO 97/10337.

Yet another control system uses ecdysone (a fruit fly steroid hormone) which binds to and activates an ecdysone receptor (cytoplasmic receptor). The receptor then translocates to the nucleus to bind a specific DNA response element (promoter from

WO 02/00724

PCT/US01/20820

ecdysone-responsive gene). The ecdysone receptor includes a transactivation domain, DNA-binding domain, and ligand-binding domain to initiate transcription. The ecdysone system is further described in U.S. Patent No. 5,514,578 and PCT Pub. Nos. WO 97/38117, WO 96/37609, and WO 93/03162.

5 Another control means uses a positive tetracycline-controllable transactivator. This system involves a mutated tet repressor protein DNA-binding domain (mutated tet R-4 amino acid changes which resulted in a reverse tetracycline-regulated transactivator protein, *i.e.*, it binds to a tet operator in the presence of tetracycline) linked to a polypeptide which activates transcription. Such systems are described in
10 U.S. Patent Nos. 5,464,758, 5,650,298, and 5,654,168.

Additional expression control systems and nucleic acid constructs are described in U.S. Patent Nos. 5,741,679 and 5,834,186, to Innovir Laboratories Inc.

In vivo gene therapy may be accomplished by introducing the gene encoding TSLPR polypeptide into cells via local injection of a TSLPR nucleic acid molecule or
15 by other appropriate viral or non-viral delivery vectors. Hefti 1994, *Neurobiology* 25:1418-35. For example, a nucleic acid molecule encoding a TSLPR polypeptide may be contained in an adeno-associated virus (AAV) vector for delivery to the targeted cells (*see, e.g.*, Johnson, PCT Pub. No. WO 95/34670; PCT App. No. PCT/US95/07178). The recombinant AAV genome typically contains AAV inverted
20 terminal repeats flanking a DNA sequence encoding a TSLPR polypeptide operably linked to functional promoter and polyadenylation sequences.

Alternative suitable viral vectors include, but are not limited to, retrovirus, adenovirus, herpes simplex virus, lentivirus, hepatitis virus, parvovirus, papovavirus, poxvirus, alphavirus, coronavirus, rhabdovirus, paramyxovirus, and papilloma virus
25 vectors. U.S. Patent No. 5,672,344 describes an *in vivo* viral-mediated gene transfer system involving a recombinant neurotrophic HSV-1 vector. U.S. Patent No. 5,399,346 provides examples of a process for providing a patient with a therapeutic protein by the delivery of human cells which have been treated *in vitro* to insert a DNA segment encoding a therapeutic protein. Additional methods and materials for
30 the practice of gene therapy techniques are described in U.S. Patent Nos. 5,631,236 (involving adenoviral vectors), 5,672,510 (involving retroviral vectors), 5,635,399 (involving retroviral vectors expressing cytokines).

Nonviral delivery methods include, but are not limited to, liposome-mediated transfer, naked DNA delivery (direct injection), receptor-mediated transfer (ligand-

WO 02/00724

PCT/US01/20820

DNA complex), electroporation, calcium phosphate precipitation, and microparticle bombardment (e.g., gene gun). Gene therapy materials and methods may also include inducible promoters, tissue-specific enhancer-promoters, DNA sequences designed for site-specific integration, DNA sequences capable of providing a selective advantage over the parent cell, labels to identify transformed cells, negative selection systems and expression control systems (safety measures), cell-specific binding agents (for cell targeting), cell-specific internalization factors, and transcription factors to enhance expression by a vector as well as methods of vector manufacture. Such additional methods and materials for the practice of gene therapy techniques are described in U.S. Patent Nos. 4,970,154 (involving electroporation techniques), 5,679,559 (describing a lipoprotein-containing system for gene delivery), 5,676,954 (involving liposome carriers), 5,593,875 (describing methods for calcium phosphate transfection), and 4,945,050 (describing a process wherein biologically active particles are propelled at cells at a speed whereby the particles penetrate the surface of the cells and become incorporated into the interior of the cells), and PCT Pub. No. WO 96/40958 (involving nuclear ligands).

It is also contemplated that TSLPR gene therapy or cell therapy can further include the delivery of one or more additional polypeptide(s) in the same or a different cell(s). Such cells may be separately introduced into the patient, or the cells may be contained in a single implantable device, such as the encapsulating membrane described above, or the cells may be separately modified by means of viral vectors.

A means to increase endogenous TSLPR polypeptide expression in a cell via gene therapy is to insert one or more enhancer elements into the TSLPR polypeptide promoter, where the enhancer elements can serve to increase transcriptional activity of the TSLPR gene. The enhancer elements used will be selected based on the tissue in which one desires to activate the gene – enhancer elements known to confer promoter activation in that tissue will be selected. For example, if a gene encoding a TSLPR polypeptide is to be “turned on” in T-cells, the *lck* promoter enhancer element may be used. Here, the functional portion of the transcriptional element to be added may be inserted into a fragment of DNA containing the TSLPR polypeptide promoter (and optionally, inserted into a vector and/or 5' and/or 3' flanking sequences) using standard cloning techniques. This construct, known as a “homologous recombination construct,” can then be introduced into the desired cells either *ex vivo* or *in vivo*.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

Gene therapy also can be used to decrease TSLPR polypeptide expression by modifying the nucleotide sequence of the endogenous promoter. Such modification is typically accomplished via homologous recombination methods. For example, a DNA molecule containing all or a portion of the promoter of the TSLPR gene selected for inactivation can be engineered to remove and/or replace pieces of the promoter that regulate transcription. For example, the TATA box and/or the binding site of a transcriptional activator of the promoter may be deleted using standard molecular biology techniques; such deletion can inhibit promoter activity thereby repressing the transcription of the corresponding TSLPR gene. The deletion of the TATA box or the transcription activator binding site in the promoter may be accomplished by generating a DNA construct comprising all or the relevant portion of the TSLPR polypeptide promoter (from the same or a related species as the TSLPR gene to be regulated) in which one or more of the TATA box and/or transcriptional activator binding site nucleotides are mutated via substitution, deletion and/or insertion of one or more nucleotides. As a result, the TATA box and/or activator binding site has decreased activity or is rendered completely inactive. This construct, which also will typically contain at least about 500 bases of DNA that correspond to the native (endogenous) 5' and 3' DNA sequences adjacent to the promoter segment that has been modified, may be introduced into the appropriate cells (either *ex vivo* or *in vivo*) either directly or via a viral vector as described herein. Typically, the integration of the construct into the genomic DNA of the cells will be via homologous recombination, where the 5' and 3' DNA sequences in the promoter construct can serve to help integrate the modified promoter region via hybridization to the endogenous chromosomal DNA.

25

Therapeutic Uses

TSLPR nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists thereof can be used to treat, diagnose, ameliorate, or prevent a number of diseases, disorders, or conditions, including TSLP-related diseases, disorders, or conditions. TSLP-related diseases, disorders, or conditions may be related to B-cell development, T-cell development, T-cell receptor gene rearrangement, or regulation of the Stat5 transcription factor. Diseases caused by or mediated by undesirable levels of TSLP are encompassed within the scope of the invention. Undesirable levels include excessive levels of TSLP and sub-normal levels of TSLP.

30

WO 02/00724

PCT/US01/20820

TSLPR polypeptide agonists and antagonists include those molecules that regulate TSLPR polypeptide activity and either increase or decrease at least one activity of the mature form of the TSLPR polypeptide. Agonists or antagonists may be co-factors, such as a protein, peptide, carbohydrate, lipid, or small molecular weight molecule, which interact with TSLPR polypeptide and thereby regulate its activity. Potential polypeptide agonists or antagonists include antibodies that react with either soluble or membrane-bound forms of TSLPR polypeptides that comprise part or all of the extracellular domains of the said proteins. Molecules that regulate TSLPR polypeptide expression typically include nucleic acids encoding TSLPR polypeptide that can act as anti-sense regulators of expression.

TSLPR nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists thereof may be used (simultaneously or sequentially) in combination with one or more cytokines, growth factors, antibiotics, anti-inflammatories, and/or chemotherapeutic agents as is appropriate for the condition being treated.

Other diseases or disorders caused by or mediated by undesirable levels of TSLPR polypeptides are encompassed within the scope of the invention. Undesirable levels include excessive levels of TSLPR polypeptides and sub-normal levels of TSLPR polypeptides.

20 Uses of TSLPR Nucleic Acids and Polypeptides

Nucleic acid molecules of the invention (including those that do not themselves encode biologically active polypeptides) may be used to map the locations of the TSLPR gene and related genes on chromosomes. Mapping may be done by techniques known in the art, such as PCR amplification and *in situ* hybridization.

TSLPR nucleic acid molecules (including those that do not themselves encode biologically active polypeptides) may be useful as hybridization probes in diagnostic assays to test, either qualitatively or quantitatively, for the presence of a TSLPR nucleic acid molecule in mammalian tissue or bodily fluid samples.

Other methods may also be employed where it is desirable to inhibit the activity of one or more TSLPR polypeptides. Such inhibition may be effected by nucleic acid molecules that are complementary to and hybridize to expression control sequences (triple helix formation) or to TSLPR mRNA. For example, antisense DNA or RNA molecules, which have a sequence that is complementary to at least a portion of a TSLPR gene can be introduced into the cell. Anti-sense probes may be designed

WO 02/00724

PCT/US01/20820

by available techniques using the sequence of the TSLPR gene disclosed herein. Typically, each such antisense molecule will be complementary to the start site (5' end) of each selected TSLPR gene. When the antisense molecule then hybridizes to the corresponding TSLPR mRNA, translation of this mRNA is prevented or reduced.

5 Anti-sense inhibitors provide information relating to the decrease or absence of a TSLPR polypeptide in a cell or organism.

Alternatively, gene therapy may be employed to create a dominant-negative inhibitor of one or more TSLPR polypeptides. In this situation, the DNA encoding a mutant polypeptide of each selected TSLPR polypeptide can be prepared and
10 introduced into the cells of a patient using either viral or non-viral methods as described herein. Each such mutant is typically designed to compete with endogenous polypeptide in its biological role.

In addition, a TSLPR polypeptide, whether biologically active or not, may be used as an immunogen, that is, the polypeptide contains at least one epitope to which
15 antibodies may be raised. Selective binding agents that bind to a TSLPR polypeptide (as described herein) may be used for *in vivo* and *in vitro* diagnostic purposes, including, but not limited to, use in labeled form to detect the presence of TSLPR polypeptide in a body fluid or cell sample. The antibodies may also be used to prevent, treat, or diagnose a number of diseases and disorders, including those recited
20 herein. The antibodies may bind to a TSLPR polypeptide so as to diminish or block at least one activity characteristic of a TSLPR polypeptide, or may bind to a polypeptide to increase at least one activity characteristic of a TSLPR polypeptide (including by increasing the pharmacokinetics of the TSLPR polypeptide).

The murine and human TSLPR nucleic acids of the present invention are also
25 useful tools for isolating the corresponding chromosomal TSLPR polypeptide genes. For example, mouse chromosomal DNA containing TSLPR sequences can be used to construct knockout mice, thereby permitting an examination of the *in vivo* role for TSLPR polypeptide. The human TSLPR genomic DNA can be used to identify heritable tissue-degenerating diseases.

30 The following examples are intended for illustration purposes only, and should not be construed as limiting the scope of the invention in any way.

Example 1: Cloning of the Murine and Human TSLPR Polypeptide Genes

WO 02/00724

PCT/US01/20820

Generally, materials and methods as described in Sambrook *et al.*, *supra* were used to clone and analyze the genes encoding murine and human TSLPR polypeptides.

Sequences encoding the murine TSLPR polypeptide were identified in a BLAST search of an EST database using sequences corresponding to the cytoplasmic domain of the erythropoietin receptor. Several overlapping murine ESTs, which encode a novel type I cytokine receptor molecule, were obtained in the BLAST search. The cytoplasmic domain of the cytokine receptor encoded by these sequences was found to share significant similarity to that of the common cytokine receptor γ chain (γ_c), the erythropoietin receptor, and the IL-9 receptor α chain.

The common cytokine receptor γ chain is an essential subunit of the receptors for IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, and 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; Giti *et al.*, 1994, *EMBO J.* 13:2822-30; Kimura *et al.*, 1995, *Int. Immunol.* 7:115-20). The mutation of γ_c in humans can result in X-linked severe combined immunodeficiency (Noguchi *et al.*, 1993, *Cell* 73:147-57; Leonard *et al.*, 1995, *Immunol. Rev.* 148:97-114).

Since none of the ESTs sequences identified in the BLAST search contained the entire open reading frame for TSLPR polypeptide, a mouse embryo library was screened to obtain a full-length cDNA. The positive colony containing the longest insert was used to prepare plasmid DNA by standard methods. The cDNA insert from this colony was 2 kb in length. DNA sequence analysis confirmed that the clone contained the entire reading frame for TSLPR polypeptide.

Sequence analysis of the full-length cDNA for murine TSLPR polypeptide indicated that the gene comprises a 1110 bp open reading frame encoding a protein of 370 amino acids and possessing a potential signal peptide of 17 amino acids in length at its amino-terminus (Figures 1A-1B; predicted signal peptide indicated by underline). The open reading frame was found to encode a type I transmembrane protein having two potential N-linked glycosylation sites and a cytoplasmic domain of 104 amino acids containing a single tyrosine residue.

In contrast, murine γ_c comprises 369 amino acids and has a cytoplasmic domain of 86 amino acids containing two tyrosine residues (Kumaki *et al.*, 1993, *Biochem.*

WO 02/00724

PCT/US01/20820

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). Figure 2 illustrates an amino acid sequence alignment of murine TSLPR polypeptide (upper sequence) and murine γ_c (lower sequence). Murine TSLPR polypeptide was found to share 26% sequence identity and 47% sequence similarity with γ_c at the amino acid level. The sequence of murine TSLPR polypeptide is somewhat atypical for type I cytokine receptors in that only one pair of cysteines is conserved and the W-S-X-W-S (SEQ ID NO: 15) motif is replaced by a W-T-A-V-T (SEQ ID NO: 16) motif. The predicted molecular weight of murine TSLPR polypeptide is 37 kD.

Sequences encoding the human TSLPR polypeptide were identified in a BLAST search of a proprietary database of cDNA sequences (Amgen, Thousand Oaks, CA) using the murine TSLPR nucleic acid sequence as a query sequence. Two clones containing human cDNA sequences and sharing the greatest homology with the murine TSLPR nucleic acid sequence were identified in this search: 9604927 (SEQ ID NO: 10) and 9508990 (SEQ ID NO: 11). Sequence analysis of the full-length cDNA for human TSLPR polypeptide (as contained in Clone 9604927) indicated that the human TSLPR gene comprises an open reading frame of 1113 bp encoding a protein of 371 amino acids and possessing a potential signal peptide of 22 amino acids in length at its amino-terminus (Figures 3A-3B; predicted signal peptide indicated by underline).

Clone 9508990 contains an open reading frame of 1137 bp encoding a protein of 379 amino acids (Figures 4A-4B). This clone essentially comprises the full-length human TSLPR polypeptide sequence and an additional 8 amino acids at the carboxyl-terminus corresponding to the FLAG epitope. Figure 5 illustrates an amino acid sequence alignment of murine TSLPR polypeptide (upper sequence) and human TSLPR polypeptide (lower sequence). The availability of murine and human TSLPR nucleic acid and amino acid sequences will further aid in the elucidation of signal transduction pathways utilized by TSLP.

30 Example 2: TSLPR Polypeptide Expression

A cDNA construct encoding the entire open reading frame for murine TSLPR was transcribed and translated *in vitro* in the presence of ^{35}S -methionine and the product resolved by SDS-PAGE. Figure 6A illustrates an autoradiogram of the gel in

WO 02/00724

PCT/US01/20820

which a single species of approximately 40 kD was obtained.

Figure 6B illustrates the immunoprecipitation of murine TSLPR polypeptide in the growth factor-dependent pre-B-cell line NAG8/7 using a rabbit polyclonal antiserum raised against the extracellular domain of murine TSLPR polypeptide. The rabbit polyclonal antiserum was generated against murine TSLPR polypeptide-glutathione S-transferase fusion protein which was cloned into the pGEX4T2 expression vector (Pharmacia) and expressed in bacteria. Prior to metabolic labeling, NAG8/7 cells were grown in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum, antibiotics, and TSLP.

10 NAG8/7 cells were metabolically labeled with ³⁵S-methionine and cysteine, lysed in 50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, and protease inhibitors, and the lysates incubated overnight with either rabbit polyclonal antiserum (lane 2) or pre-immune serum (lane 1). The immune complexes were captured with Protein G sepharose, washed in lysis buffer, and then resolved by SDS-PAGE. The polyclonal antiserum specifically immunoprecipitated a broad band of approximately 15 50 kD in a pre-B-cell line NAG8/7 (Figure 6B). The larger size of the immunoprecipitated product as compared with the product generated by *in vitro* translation is consistent with the addition of N-linked carbohydrate moieties in the extracellular domain. Flow cytometric analysis of transfected 293 cells and several hematopoietic cell lines (*i.e.*, 32D, BaF3, and WEHI-3) confirmed that murine TSLPR was expressed at the cell surface.

Example 3: TSLPR mRNA Expression

The tissue distribution of murine TSLPR was examined by northern blot analysis. A mouse multiple tissue northern blot (Clontech, Palo Alto, CA) was 25 screened with a ³²P-labeled TSLPR cDNA probe using standard techniques. Murine TSLPR mRNA transcripts were detected in nearly all of the tissues examined, with highest levels of expression being detected in the lung, liver, and testis (Figure 6C). Lower levels of expression were detected in the heart, brain, spleen, and skeletal 30 muscle. Two transcripts of approximately 2 kb and 2.2 kb were detected in some tissues, whereas only a single transcript of approximately 2 kb was detected in other tissues. The broad tissue distribution of murine TSLPR mRNA differs from the relatively restricted lympho-hematopoietic pattern of expression observed for γ_c .

WO 02/00724

PCT/US01/20820

The expression of TSLPR mRNA can be localized by *in situ* hybridization as follows. A panel of normal embryonic and adult mouse tissues is fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned at 5 μ m. Sectioned tissues are permeabilized in 0.2 M HCl, digested with Proteinase K, and acetylated with triethanolamine and acetic anhydride. Sections are prehybridized for 1 hour at 60°C in hybridization solution (300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 1X Denhardt's solution, 0.2% SDS, 10 mM DTT, 0.25 mg/ml tRNA, 25 μ g/ml polyA, 25 μ g/ml polyC and 50% formamide) and then hybridized overnight at 60°C in the same solution containing 10% dextran and 2×10^4 cpm/ μ l of a 32 P-labeled antisense riboprobe complementary to the human TSLPR gene. The riboprobe is obtained by *in vitro* transcription of a clone containing human TSLPR cDNA sequences using standard techniques.

Following hybridization, sections are rinsed in hybridization solution, treated with RNaseA to digest unhybridized probe, and then washed in 0.1X SSC at 55°C for 30 minutes. Sections are then immersed in NTB-2 emulsion (Kodak, Rochester, NY), exposed for 3 weeks at 4°C, developed, and counterstained with hematoxylin and eosin. Tissue morphology and hybridization signal are simultaneously analyzed by darkfield and standard illumination for brain (one sagittal and two coronal sections), gastrointestinal tract (esophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, proximal colon, and distal colon), pituitary, liver, lung, heart, spleen, thymus, lymph nodes, kidney, adrenal, bladder, pancreas, salivary gland, male and female reproductive organs (ovary, oviduct, and uterus in the female; and testis, epididymus, prostate, seminal vesicle, and vas deferens in the male), BAT and WAT (subcutaneous, perirenal), bone (femur), skin, breast, and skeletal muscle.

Example 4: Biological Activity of Murine TSLPR Polypeptide

The similarity between murine TSLPR polypeptide and the erythropoietin receptor suggested that murine TSLPR, like the erythropoietin receptor, could be activated by homodimerization. This was examined in a proliferation assay using a chimeric construct derived from the extracellular and transmembrane domains of the c-Kit receptor and the cytoplasmic domain of murine TSLPR polypeptide. To generate this construct, the extracellular and transmembrane domains of c-Kit and the cytoplasmic domain of TSLPR were amplified by PCR and ligated into the retroviral

WO 02/00724

PCT/US01/20820

vector pMX-IRES-GFP using standard techniques.

IL-2-dependent CTLL2 cells were stably transfected with expression constructs encoding c-Kit/TSLPR and c-Kit/ β , c-Kit/ β and c-Kit/ γ , or c-Kit/ γ alone. The constructs for c-Kit/ β and c-Kit/ γ were as described by Nelson *et al.*, 1994, *Nature* 369:333-36. Following transfection, CTLL2 cells were deprived of IL-2, transferred into 48-well dishes at 10,000 cells/well, and grown in the absence or presence of Stem Cell Factor (SCF), the ligand for c-Kit. Cells were counted after 7 days of growth in culture.

Figure 7 illustrates that when IL-2 was replaced by SCF, CTLL2 cells stably expressing chimeric c-Kit/TSLPR polypeptide were unable to grow, suggesting that simple homodimerization of the cytoplasmic domain of murine TSLPR polypeptide is insufficient to induce a proliferative signal. Similar results have been obtained in proliferation experiments using a chimeric c-Kit/ γ polypeptide (Nelson *et al.*, *supra*). Furthermore, when CTLL2 cells were co-transfected with c-Kit/TSLPR and c-Kit/ β , the cells were still unable to proliferate. However, CTLL2 cells co-transfected with c-Kit/ β and c-Kit/ γ were able to proliferate following incubation with SCF. This suggested that the cytoplasmic domain of the IL-2R β chain could not cooperate with the cytoplasmic domain of murine TSLPR polypeptide to initiate proliferation, and that murine TSLPR polypeptide might oligomerize with some other receptor to participate in signal transduction.

The similarity between murine TSLPR polypeptide and γ_c suggested that murine TSLPR may have the capacity to bind to some of the members of the IL-2 cytokine subfamily. This was examined in an affinity labeling assay using ¹²⁵I-labeled IL-2, IL-4, IL-7, and IL-15. Prior to the addition of an ¹²⁵I-labeled cytokine, 293 cells were reconstituted with the cytokine specific subunits IL-2R β , IL-4R α , or IL-7R α in the presence of either γ_c or murine TSLPR polypeptide. None of the ligands examined exhibited binding when murine TSLPR was co-expressed with a cytokine specific subunit, even though the ligands efficiently bound when γ_c was co-expressed with a cytokine specific subunit. This suggested that murine TSLPR polypeptide either bound a novel cytokine or bound a known cytokine in conjunction with a novel or untested subunit.

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is a cytokine whose biological activities overlap with those of IL-7. TSLP activity was originally identified in the

WO 02/00724

PCT/US01/20820

conditioned medium of a thymic stromal cell line that supported the development of murine IgM⁺ B-cells from fetal liver hematopoietic progenitor cells (Friend *et al.*, 1994 *Exp. Hematol.* 22:321-28). Moreover, TSLP can promote B-cell lymphopoiesis in long-term bone marrow cultures and can co-stimulate both thymocytes and mature T-cells (Friend *et al.*, *supra*; Levin *et al.*, 1999, *J. Immunol.* 162:677-83).

Although IL-7 also possesses these activities (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 is unique in that it promotes B lymphopoiesis to the IgM⁺ immature B-cell stage, while IL-7 primarily facilitates production of IgM⁺ pre-B-cells (Levin *et al.*, *supra*; Candeias *et al.*, 1997, *Immunity* 6:501-08). One possible explanation for the overlapping biological activities of IL-7 and TSLP is that TSLP signals via a receptor containing the IL-7R α chain (Levin *et al.*, *supra*). However, antibody inhibition experiments have indicated that TSLP does not require γ_c to exert its effects (Levin *et al.*, *supra*). These results suggested that TSLP would bind murine TSLPR polypeptide in the presence of IL-7R α .

The binding of TSLP to TSLPR polypeptide in the presence of IL-7R α was examined in affinity labeling assays. Affinity labeling assays were performed by adding 1-5 nM of ¹²⁵I-labeled TSLP to 5 x 10⁶ 293 cells transfected with expression constructs for murine IL-7R α , murine TSLPR polypeptide, murine IL-7R α and murine TSLPR polypeptide, or human IL-7R α and murine TSLPR polypeptide. Iodinated TSLP was prepared by adding IODO-GEN (Pierce, Rockford, IL) and 2 mCi ¹²⁵I to 1 μ g of TSLP. A specific activity of approximately 200-300 μ Ci/ μ g was obtained by this method. Prior to affinity labeling, 293 cells were transiently transfected using the calcium phosphate method (Eppendorf-5 Prime, Boulder, CO). Following a 2 hour incubation with ¹²⁵I-TSLP, cells were cross-linked with 0.1 mg/ml disuccinimidyl suberate (Pierce), lysed in lysis buffer, and the lysates resolved by SDS-PAGE.

As shown in Figure 8A, ¹²⁵I-TSLP bound to the heterodimer of murine IL-7R α and murine TSLPR polypeptide (lane 4). The upper band corresponds to cross-linked murine IL-7R α and the lower band corresponds to cross-linked murine TSLPR polypeptide. In addition, ¹²⁵I-TSLP also bound the heterodimer of human IL-7R α and murine TSLPR polypeptide (lane 5). No TSLP binding was observed with murine IL-7R α alone (lane 2).

WO 02/00724

PCT/US01/20820

Affinity labeling assays were also performed using a FLAG-tagged version of murine TSLPR polypeptide. Murine TSLPR-FLAG polypeptide was derived by PCR amplifying a fragment containing the coding region of TSLPR polypeptide using a 3' primer containing sequence corresponding to the FLAG epitope. This PCR product was then subcloned into pCR3.1 (Invitrogen) and the resulting clone analyzed by sequencing. Affinity labeling assays were performed as described herein, with the exception that cell lysates were immunoprecipitated with an anti-FLAG monoclonal M2 antibody. As shown in Figure 8B, following TSLPR immunoprecipitation, a cross-linked TSLPR band was observed (lane 1), indicating that TSLP exhibits weak binding to TSLPR alone.

To examine whether murine IL-7 could compete for TSLP binding in cells expressing TSLPR polypeptide and IL-7R α , competition assays were performed. Cellular lysates were analyzed as described herein, with the exception that increasing amounts of unlabeled murine IL-7 were added with ¹²⁵I-TSLP. As shown in Figure 8C, an excess of murine IL-7 inhibited the binding of TSLP to the IL-7R α /TSLPR polypeptide heterodimer. The affinity labeling assays illustrated the cooperativity of IL-7R α and murine TSLPR polypeptide for binding TSLP. These assays also established that IL-7 can compete for the binding of TSLP, which has implications for potential competition between these two cytokines *in vivo*.

The binding of TSLP to 293 cells transfected with murine IL-7R α and murine TSLPR polypeptide, or murine IL-7R α alone, was analyzed in a displacement binding assay. Following two washes, 1 x 10⁶ transfected 293 cells were incubated in a constant amount of ¹²⁵I-labeled TSLP (approximately 20,000 cpm) and varying amounts of unlabeled TSLP. Following a 3 hour incubation, treated cells were separated from the medium by centrifugation in olive oil and N-butylphthalate. Cell-bound radioactivity was measured using a gamma counter.

As shown in Figure 9A, non-specific binding of ¹²⁵I-TSLP was observed with cells transfected with murine IL-7R α alone (or vector alone), while specific binding of ¹²⁵I-TSLP was observed with cells transfected with both IL-7R α and TSLPR polypeptide, with excess unlabeled TSLP competing for binding of ¹²⁵I-TSLP. Cells transfected with TSLPR polypeptide alone exhibited very low binding. Analysis of binding data by Scatchard transformation was performed using the LIGAND computer program (Munson and Rodbard, 1980, *Anal. Biochem.* 107:220-39). The K_d for the binding of TSLP to cells expressing TSLPR polypeptide and IL-7R α was

WO 02/00724

PCT/US01/20820

determined to be approximately 13 nM (Figure 9B). In seven independent experiments, the K_d was found to range from 1.2 to 40 nM. Due to the very low binding activity of TSLP for cells expressing TSLPR polypeptide alone, it was not possible to determine the K_d for these cells. Displacement binding assays were also performed using NAG8/7 cells, which constitutively express TSLP receptors and proliferate in response to TSLP (Friend *et al.*, *supra*; Levin *et al.*, *supra*). In these displacement binding assays, 5×10^6 NAG8/7 cells were incubated in a constant amount of ^{125}I -labeled TSLP (approximately 180,000 cpm) and varying amounts of unlabeled TSLP. The remainder of the assay was performed as described herein. As shown in Figure 9C, the Scatchard transformation of binding data obtained using NAG8/7 cells suggested the cells expressed a single class of receptors having a K_d of approximately 2.2 nM – results that are similar to those obtained using the transfected 293 cells.

Displacement binding assays were also performed to compare the displacement of ^{125}I -labeled TSLP by IL-7 or unlabeled TSLP in 293 cells transfected with TSLPR polypeptide and IL-7R α . Figure 9D illustrates that murine IL-7 competes for binding to TSLPR polypeptide.

It has been previously shown that treatment of NAG8/7 cells with either IL-7 or TSLP activates STAT5 (Friend *et al.*, *supra*; Levin *et al.*, *supra*). The possible role of TSLPR polypeptide in STAT5 activation was analyzed in CAT assays using HepG2 cells. Expression constructs for IL-7R α and TSLPR, or IL-7R α and γ_c , were introduced into HepG2 cells with the pHRRE-CAT vector by calcium phosphate transfection. The pHRRE-CAT vector contains eight tandem copies of the 27 bp cytokine-inducible hematopoietin receptor response element and STAT5b (Ziegler *et al.*, 1995, *Eur. J. Immunol.* 25:399-404). Transfected cells were allowed to recover overnight, after which the cells were trypsinized and plated in 6-well culture dishes. The cells were allowed to adhere to the plates during a 24 hour incubation, and the cells were then incubated in serum free medium containing 100 ng/ml of either IL-7 or TSLP, for an additional 24 hours.

The CAT activity and fold stimulation after normalizing for transfection efficiencies is shown in Figure 10. No increase in CAT activity was seen after TSLP stimulation in the presence of IL-7R α alone (lane 2) or with IL-7R α and γ_c (lane 7). However, if TSLPR polypeptide was co-transfected, a dramatic increase in CAT

WO 02/00724

PCT/US01/20820

activity was observed following TSLP stimulation (lane 5). This demonstrates that the presence of TSLPR polypeptide is required for TSLP signaling. While co-transfection of γ_c and IL-7R α had no effect on TSLP-dependent reporter activity, this combination effectively mediated IL-7-dependent reporter activation (lane 9).

5

A number of cytokine receptor chains are shared by more than one cytokine. The best known examples are gp130, which is shared by IL-6, IL-11, ciliary neurotropic factor, leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and cardiotrophin-I (Hirano *et al.*, 1997, *Cytokine Growth Factor Rev.* 8:241-52; Taga and Kishimoto, 1997, *Annu. Rev. Immunol.* 15:797-819), β_c , which is shared by IL-3, IL-5, and 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), and γ_c , which is shared by IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, and IL-15 (Noguchi *et al.*, 1993, *Science* 262:1877-80; Kondo *et al.*, 1994, *supra*; Kondo *et al.*, 1993, *supra*; Russell *et al.*, 1994, *supra*; Takeshita *et al.*, *supra*; Russell *et al.*, 1993, *supra*; Giri *et al.*, *supra*; Kimura *et al.*, *supra*). The list of cytokine receptor chains that serve as components of more than one cytokine receptor includes IL-2R β , which is a component of both the IL-2 and IL-15 receptors, and IL-4R α , which is a component of both the IL-4 and IL-13 receptors. The cytokine receptor subunit IL-7R α can now be added to this list as the data presented herein demonstrates that this subunit is a component of both the IL-7 and TSLP receptors.

The observation of defects in T-cell and B-cell development in *Il7^{-/-}* mice (von Freeden-Jeffrey *et al.*, 1995, *J. Exp. Med.* 181:1519-26) suggests that TSLP cannot fully compensate for the loss of IL-7. An examination of the functional cooperation of IL-7R α in TSLP signaling may help to explain the differences in B-cell development in *Il7r^{-/-}* and *Il7^{-/-}* mice (Candeias *et al.*, 1997, *Immunity* 6:501-08; von Freeden-Jeffrey *et al.*, *supra*; Peschon *et al.*, 1994, *J. Exp. Med.* 180:1955-60; He *et al.*, 1997, *J. Immunol.* 158:2592-99). The further characterization of TSLPR polypeptide will aid this investigation.

30

Example 5: Production of TSLPR Polypeptides

A. Expression of TSLPR Polypeptides in Bacteria

WO 02/00724

PCT/US01/20820

PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a TSLPR polypeptide using primers corresponding to the 5' and 3' ends of the sequence. The amplified DNA products may be modified to contain restriction enzyme sites to allow for insertion into expression vectors. PCR products are gel purified and inserted into expression vectors using standard recombinant DNA methodology. An exemplary vector, such as pAMG21 (ATCC no. 98113) containing the lux promoter and a gene encoding kanamycin resistance is digested with Bam HI and Nde I for directional cloning of inserted DNA. The ligated mixture is transformed into an *E. coli* host strain by electroporation and transformants are selected for kanamycin resistance. Plasmid DNA from selected colonies is isolated and subjected to DNA sequencing to confirm the presence of the insert.

Transformed host cells are incubated in 2xYT medium containing 30 µg/mL kanamycin at 30°C prior to induction. Gene expression is induced by the addition of N-(3-oxohexanoyl)-dl-homoserine lactone to a final concentration of 30 ng/mL followed by incubation at either 30°C or 37°C for six hours. The expression of TSLPR polypeptide is evaluated by centrifugation of the culture, resuspension and lysis of the bacterial pellets, and analysis of host cell proteins by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Inclusion bodies containing TSLPR polypeptide are purified as follows. Bacterial cells are pelleted by centrifugation and resuspended in water. The cell suspension is lysed by sonication and pelleted by centrifugation at 195,000 xg for 5 to 10 minutes. The supernatant is discarded, and the pellet is washed and transferred to a homogenizer. The pellet is homogenized in 5 mL of a Percoll solution (75% liquid Percoll and 0.15 M NaCl) until uniformly suspended and then diluted and centrifuged at 21,600 xg for 30 minutes. Gradient fractions containing the inclusion bodies are recovered and pooled. The isolated inclusion bodies are analyzed by SDS-PAGE.

A single band on an SDS polyacrylamide gel corresponding to *E. coli*-produced TSLPR polypeptide is excised from the gel, and the N-terminal amino acid sequence is determined essentially as described by Matsudaira *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:10-35.

B. Expression of TSLPR Polypeptide in Mammalian Cells

PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a TSLPR polypeptide using primers corresponding to the 5' and 3' ends of the sequence. The

WO 02/00724

PCT/US01/20820

amplified DNA products may be modified to contain restriction enzyme sites to allow for insertion into expression vectors. PCR products are gel purified and inserted into expression vectors using standard recombinant DNA methodology. An exemplary expression vector, pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), that contains an Epstein-Barr virus origin of replication, may be used for the expression of TSLPR polypeptides in 293-EBNA-1 cells. Amplified and gel purified PCR products are ligated into pCEP4 vector and introduced into 293-EBNA cells by lipofection. The transfected cells are selected in 100 µg/mL hygromycin and the resulting drug-resistant cultures are grown to confluence. The cells are then cultured in serum-free media for 72 hours. The conditioned media is removed and TSLPR polypeptide expression is analyzed by SDS-PAGE.

TSLPR polypeptide expression may be detected by silver staining. Alternatively, TSLPR polypeptide is produced as a fusion protein with an epitope tag, such as an IgG constant domain or a FLAG epitope, which may be detected by Western blot analysis using antibodies to the peptide tag.

TSLPR polypeptides may be excised from an SDS-polyacrylamide gel, or TSLPR fusion proteins are purified by affinity chromatography to the epitope tag, and subjected to N-terminal amino acid sequence analysis as described herein.

20 C. Expression and Purification of TSLPR Polypeptide in Mammalian Cells

TSLPR polypeptide expression constructs are introduced into 293 EBNA or CHO cells using either a lipofection or calcium phosphate protocol.

To conduct functional studies on the TSLPR polypeptides that are produced, large quantities of conditioned media are generated from a pool of hygromycin selected 293 EBNA clones. The cells are cultured in 500 cm Nunc Triple Flasks to 80% confluence before switching to serum free media a week prior to harvesting the media. Conditioned media is harvested and frozen at -20°C until purification.

Conditioned media is purified by affinity chromatography as described below. The media is thawed and then passed through a 0.2 µm filter. A Protein G column is equilibrated with PBS at pH 7.0, and then loaded with the filtered media. The column is washed with PBS until the absorbance at A₂₈₀ reaches a baseline. TSLPR polypeptide is eluted from the column with 0.1 M Glycine-HCl at pH 2.7 and

WO 02/00724

PCT/US01/20820

immediately neutralized with 1 M Tris-HCl at pH 8.5. Fractions containing TSLPR polypeptide are pooled, dialyzed in PBS, and stored at -70°C.

For Factor Xa cleavage of the human TSLPR polypeptide-Fc fusion polypeptide, affinity chromatography-purified protein is dialyzed in 50 mM Tris-HCl, 5 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ at pH 8.0. The restriction protease Factor Xa is added to the dialyzed protein at 1/100 (w/w) and the sample digested overnight at room temperature.

Example 6: Production of Anti-TSLPR Polypeptide Antibodies

10 Antibodies to TSLPR polypeptides may be obtained by immunization with purified protein or with TSLPR peptides produced by biological or chemical synthesis. Suitable procedures for generating antibodies include those described in Hudson and Bay, *Practical Immunology* (2nd ed., Blackwell Scientific Publications).

In one procedure for the production of antibodies, animals (typically mice or 15 rabbits) are injected with a TSLPR antigen (such as a TSLPR polypeptide), and those with sufficient serum titer levels as determined by ELISA are selected for hybridoma production. Spleens of immunized animals are collected and prepared as single cell suspensions from which splenocytes are recovered. The splenocytes are fused to mouse myeloma cells (such as Sp2/0-Ag14 cells), are first incubated in DMEM with 20 200 U/mL penicillin, 200 µg/mL streptomycin sulfate, and 4 mM glutamine, and are then incubated in HAT selection medium (hypoxanthine, aminopterin, and thymidine). After selection, the tissue culture supernatants are taken from each fusion well and tested for anti-TSLPR antibody production by ELISA.

Alternative procedures for obtaining anti-TSLPR antibodies may also be 25 employed, such as the immunization of transgenic mice harboring human Ig loci for production of human antibodies, and the screening of synthetic antibody libraries, such as those generated by mutagenesis of an antibody variable domain.

Example 7: Expression of TSLPR Polypeptide in Transgenic Mice

30 To assess the biological activity of TSLPR polypeptide, a construct encoding a TSLPR polypeptide/Fc fusion protein under the control of a liver specific ApoE promoter is prepared. The delivery of this construct is expected to cause pathological changes that are informative as to the function of TSLPR polypeptide. Similarly, a construct containing the full-length TSLPR polypeptide under the control of the beta

WO 02/00724

PCT/US01/20820

actin promoter is prepared. The delivery of this construct is expected to result in ubiquitous expression.

To generate these constructs, PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a TSLPR polypeptide using primers that correspond to the 5' and 3' ends of the desired sequence and which incorporate restriction enzyme sites to permit insertion of the amplified product into an expression vector. Following amplification, PCR products are gel purified, digested with the appropriate restriction enzymes, and ligated into an expression vector using standard recombinant DNA techniques. For example, amplified TSLPR polypeptide sequences can be cloned into an expression vector under the control of the human β -actin promoter as described by Graham *et al.*, 1997, *Nature Genetics*, 17:272-74 and Ray *et al.*, 1991, *Genes Dev.* 5:2265-73.

Following ligation, reaction mixtures are used to transform an *E. coli* host strain by electroporation and transformants are selected for drug resistance. Plasmid DNA from selected colonies is isolated and subjected to DNA sequencing to confirm the presence of an appropriate insert and absence of mutation. The TSLPR polypeptide expression vector is purified through two rounds of CsCl density gradient centrifugation, cleaved with a suitable restriction enzyme, and the linearized fragment containing the TSLPR polypeptide transgene is purified by gel electrophoresis. The purified fragment is resuspended in 5 mM Tris, pH 7.4, and 0.2 mM EDTA at a concentration of 2 mg/mL.

Single-cell embryos from BDF1 x BDF1 bred mice are injected as described (PCT Pub. No. WO 97/23614). Embryos are cultured overnight in a CO₂ incubator and 15-20 two-cell embryos are transferred to the oviducts of a pseudopregnant CD1 female mice. Offspring obtained from the implantation of microinjected embryos are screened by PCR amplification of the integrated transgene in genomic DNA samples as follows. Ear pieces are digested in 20 mL ear buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, and 500 mg/mL proteinase K) at 55°C overnight. The sample is then diluted with 200 μ L of TE, and 2 μ L of the ear sample is used in a PCR reaction using appropriate primers.

At 8 weeks of age, transgenic founder animals and control animals are sacrificed for necropsy and pathological analysis. Portions of spleen are removed and total cellular RNA isolated from the spleens using the Total RNA Extraction Kit (Qiagen) and transgene expression determined by RT-PCR. RNA recovered from spleens is converted to cDNA using the SuperScriptTM Pre-amplification System

WO 02/00724

PCT/US01/20820

(Gibco-BRL) as follows. A suitable primer, located in the expression vector sequence and 3' to the TSLPR polypeptide transgene, is used to prime cDNA synthesis from the transgene transcripts. Ten mg of total spleen RNA from transgenic founders and controls is incubated with 1 mM of primer for 10 minutes at 70°C and placed on ice.

5 The reaction is then supplemented with 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM of each dNTP, 0.1 mM DTT, and 200 U of SuperScript II reverse transcriptase. Following incubation for 50 minutes at 42°C, the reaction is stopped by heating for 15 minutes at 72°C and digested with 2U of RNase H for 20 minutes at 37°C. Samples are then amplified by PCR using primers specific for TSLPR

10 polypeptide.

Determining the phenotypes of *Tslp*^{-/-} or *Tslpr*^{-/-} mice will also assist in defining the exact role of TSLP.

Example 8: Biological Activity of TSLPR Polypeptide in Transgenic Mice

15 Prior to euthanasia, transgenic animals are weighed, anesthetized by isofluorane and blood drawn by cardiac puncture. The samples are subjected to hematology and serum chemistry analysis. Radiography is performed after terminal exsanguination. Upon gross dissection, major visceral organs are subject to weight analysis.

20 Following gross dissection, tissues (*i.e.*, liver, spleen, pancreas, stomach, the entire gastrointestinal tract, kidney, reproductive organs, skin and mammary glands, bone, brain, heart, lung, thymus, trachea, esophagus, thyroid, adrenals, urinary bladder, lymph nodes and skeletal muscle) are removed and fixed in 10% buffered Zn-Formalin for histological examination. After fixation, the tissues are processed

25 into paraffin blocks, and 3 mm sections are obtained. All sections are stained with hematoxylin and eosin, and are then subjected to histological analysis.

The spleen, lymph node, and Peyer's patches of both the transgenic and the control mice are subjected to immunohistology analysis with B cell and T cell specific antibodies as follows. The formalin fixed paraffin embedded sections are deparaffinized and hydrated in deionized water. The sections are quenched with 3%

30 hydrogen peroxide, blocked with Protein Block (Lipshaw, Pittsburgh, PA), and incubated in rat monoclonal anti-mouse B220 and CD3 (Harlan, Indianapolis, IN). Antibody binding is detected by biotinylated rabbit anti-rat immunoglobulins and peroxidase conjugated streptavidin (BioGenex, San Ramon, CA) with DAB as a

WO 02/00724

PCT/US01/20820

chromagen (BioTek, Santa Barbara, CA). Sections are counterstained with hematoxylin.

After necropsy, MLN and sections of spleen and thymus from transgenic animals and control littermates are removed. Single cell suspensions are prepared by gently grinding the tissues with the flat end of a syringe against the bottom of a 100 mm nylon cell strainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Cells are washed twice, counted, and approximately 1×10^6 cells from each tissue are then incubated for 10 minutes with 0.5 μg CD16/32(Fc γ III/II) Fe block in a 20 μL volume. Samples are then stained for 30 minutes at 2-8°C in a 100 μL volume of PBS (lacking Ca^{2+} and Mg^{2+}), 0.1% bovine serum albumin, and 0.01% sodium azide with 0.5 μg antibody of FITC or PE-conjugated monoclonal antibodies against CD90.2 (Thy-1.2), CD45R (B220), CD11b (Mac-1), Gr-1, CD4, or CD8 (PharMingen, San Diego, CA). Following antibody binding, the cells are washed and then analyzed by flow cytometry on a FACScan (Becton Dickinson).

15

While the present invention has been described in terms of the preferred embodiments, it is understood that variations and modifications will occur to those skilled in the art. Therefore, it is intended that the appended claims cover all such equivalent variations that come within the scope of the invention as claimed.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
 - 5 (a) the nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, or SEQ ID NO: 11;
 - (b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8;
 - (c) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly
10 stringent conditions to the complement of either (b) or (c); and
 - (d) a nucleotide sequence complementary to either (b) or (c).

2. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
 - 1.5 (a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide which is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8;
 - (b) a nucleotide sequence encoding an allelic variant or splice variant of
20 the nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, or SEQ ID NO: 11, or (a);
 - (c) a region of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, or SEQ ID NO: 11, (a), or (b) encoding a polypeptide
25 fragment of at least about 25 amino acid residues, wherein the polypeptide fragment has an activity of the encoded polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8, or is antigenic;
 - (d) a region of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, or SEQ ID NO: 11, or any of (a) - (c) comprising a fragment
of at least about 16 nucleotides;
 - 30 (e) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a) - (d); and
 - (f) a nucleotide sequence complementary to any of (a) - (d).

WO 02/00724

PCT/US01/20820

3. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
- (a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8;
 - (b) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8 with at least one amino acid insertion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8;
 - (c) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8 with at least one amino acid deletion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8;
 - (d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8;
 - (e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8;
 - (f) a nucleotide sequence of any of (a) - (e) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;
 - (g) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a) - (f); and
 - (h) a nucleotide sequence complementary to any of (a) - (e).
4. A vector comprising the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.
5. A host cell comprising the vector of Claim 4.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

6. The host cell of Claim 5 that is a eukaryotic cell.
7. The host cell of Claim 5 that is a prokaryotic cell.
- 5 8. A process of producing a TSLPR polypeptide comprising culturing the host cell of Claim 5 under suitable conditions to express the polypeptide, and optionally isolating the polypeptide from the culture.
- 10 9. A polypeptide produced by the process of Claim 8.
10. The process of Claim 8, wherein the nucleic acid molecule comprises promoter DNA other than the promoter DNA for the native TSLPR polypeptide operatively linked to the DNA encoding the TSLPR polypeptide.
- 15 11. The isolated nucleic acid molecule according to Claim 2, wherein the percent identity is determined using a computer program selected from the group consisting of GAP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, and the Smith-Waterman algorithm.
- 20 12. A process for determining whether a compound inhibits TSLPR polypeptide activity or TSLPR polypeptide production comprising exposing a cell according to any of Claims 5, 6, or 7 to the compound and measuring TSLPR polypeptide activity or TSLPR polypeptide production in said cell.
- 25 13. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8.
14. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected
30 from the group consisting of:
- (a) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 6 or SEQ ID NO: 9, optionally further comprising an amino-terminal methionine;
- (b) an amino acid sequence for an ortholog of either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8;

WO 02/00724

PCT/US01/20820

- (c) an amino acid sequence which is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8;
- 5 (d) a fragment of the amino acid sequence set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the fragment has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8, or is antigenic; and
- (e) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8, or any of (a) - (c).
- 10
15. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:
- 15 (a) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8;
- (b) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8 with at least one amino acid insertion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8;
- 20 (c) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8;
- 25 (d) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8; and
- (e) the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8.
- 30

WO 02/00724

PCT/US01/20820

16. An isolated polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8.
- 5 17. The isolated polypeptide according to Claim 14, wherein the percent identity is determined using a computer program selected from the group consisting of GAP, BLASTP, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, and the Smith-Waterman algorithm.
- 10 18. A selective binding agent or fragment thereof that specifically binds the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15.
- 15 19. The selective binding agent or fragment thereof of Claim 18 that specifically binds the polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8, or a fragment thereof.
- 20 20. The selective binding agent of Claim 18 that is an antibody or fragment thereof.
- 20 21. The selective binding agent of Claim 18 that is a humanized antibody.
22. The selective binding agent of Claim 18 that is a human antibody or fragment thereof.
- 25 23. The selective binding agent of Claim 18 that is a polyclonal antibody or fragment thereof.
24. The selective binding agent Claim 18 that is a monoclonal antibody or fragment thereof.
- 30 25. The selective binding agent of Claim 18 that is a chimeric antibody or fragment thereof.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

26. The selective binding agent of Claim 18 that is a CDR-grafted antibody or fragment thereof.
27. The selective binding agent of Claim 18 that is an antiidiotypic antibody or fragment thereof.
28. The selective binding agent of Claim 18 that is a variable region fragment.
29. The variable region fragment of Claim 28 that is a Fab or a Fab' fragment.
30. A selective binding agent or fragment thereof comprising at least one complementarity determining region with specificity for a polypeptide having the amino acid sequence of either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8.
31. The selective binding agent of Claim 18 that is bound to a detectable label.
32. The selective binding agent of Claim 18 that antagonizes TSLPR polypeptide biological activity.
33. A method for treating, preventing, or ameliorating a TSLPR polypeptide-related disease, condition, or disorder comprising administering to a patient an effective amount of a selective binding agent according to Claim 18.
34. A selective binding agent produced by immunizing an animal with a polypeptide comprising an amino acid sequence of either SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8.
35. A hybridoma that produces a selective binding agent capable of binding a polypeptide according to any of Claims 1, 2, or 3.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

36. A method of detecting or quantitating the amount of TSLPR polypeptide using the anti-TSLPR antibody or fragment of Claim 18.
37. A composition comprising the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, and a pharmaceutically acceptable formulation agent.
38. The composition of Claim 37, wherein the pharmaceutically acceptable formulation agent is a carrier, adjuvant, solubilizer, stabilizer, or anti-oxidant.
39. The composition of Claim 37 wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence as set forth in either SEQ ID NO: 6 or SEQ ID NO: 9.
40. A polypeptide comprising a derivative of the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15.
41. The polypeptide of Claim 40 that is covalently modified with a water-soluble polymer.
42. The polypeptide of Claim 41, wherein the water-soluble polymer is selected from the group consisting of polyethylene glycol, monomethoxy-polyethylene glycol, dextran, cellulose, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide copolymers, polyoxyethylated polyols, and polyvinyl alcohol.
43. A composition comprising a nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 and a pharmaceutically acceptable formulation agent.
44. The composition of Claim 43, wherein said nucleic acid molecule is contained in a viral vector.
45. A viral vector comprising a nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

46. A fusion polypeptide comprising the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15 fused to a heterologous amino acid sequence.
47. The fusion polypeptide of Claim 46, wherein the heterologous amino acid sequence is an IgG constant domain or fragment thereof.
48. A method for treating, preventing, or ameliorating a medical condition comprising administering to a patient the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, or the polypeptide encoded by the nucleic acid of any of Claims 1, 2, or 3.
49. A method of diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition in a subject comprising:
- (a) determining the presence or amount of expression of the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, or the polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 in a sample; and
 - (b) diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition based on the presence or amount of expression of the polypeptide.
50. A device, comprising:
- (a) a membrane suitable for implantation; and
 - (b) cells encapsulated within said membrane, wherein said cells secrete a protein of any of Claims 13, 14, or 15; and
- said membrane is permeable to said protein and impermeable to materials detrimental to said cells.
51. A method of identifying a compound which binds to a TSLPR polypeptide comprising:
- (a) contacting the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15 with a compound; and
 - (b) determining the extent of binding of the TSLPR polypeptide to the compound.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

52. The method of Claim 51, further comprising determining the activity of the polypeptide when bound to the compound.
53. A method of modulating levels of a polypeptide in an animal comprising administering to the animal the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.
54. A transgenic non-human mammal comprising the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.
55. A process for determining whether a compound inhibits TSLPR polypeptide activity or TSLPR polypeptide production comprising exposing a transgenic mammal according to Claim 54 to the compound, and measuring TSLPR polypeptide activity or TSLPR polypeptide production in said mammal.
56. A nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 attached to a solid support.
57. An array of nucleic acid molecules comprising at least one nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

WO 02/00724

PCT/US01/20820

FIG. 1A

```

ccccctcgc gccgaccocct gaccccgccc cgcgccgccc acccaggggc ccagacctga 60
gcggcgccca ggtcgcgggt gacgtcacag ggcggttgcc ccacccgtcc cgtggcctgg 120
acggacagag ctgaggcagg ggaataaccg cgagtgcctga g atg gca tgg gca ctc 176
Ala Val Ile Leu Leu Pro Arg Leu Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
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 gcc 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 tyt 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

```

WO 02/00724

PCT/US01/20820

FIG. 1B

```

tat gac ttc cgg gtt cgg gcg tgc 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

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

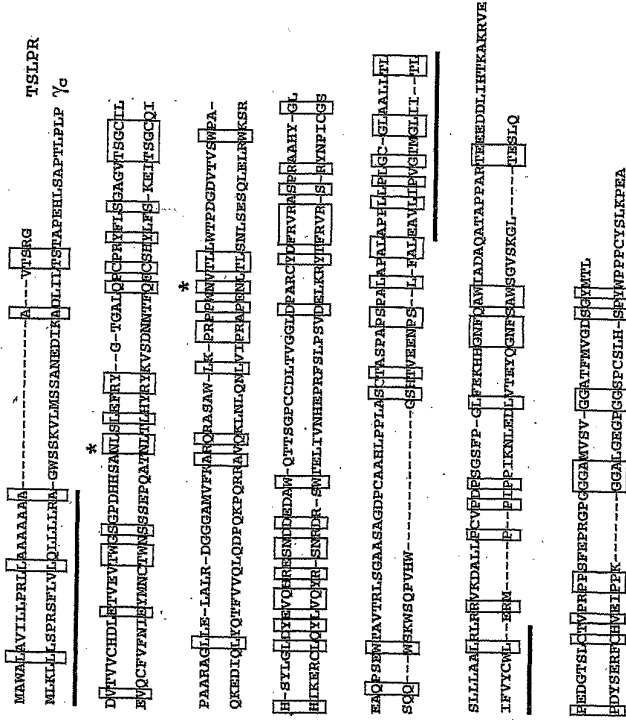
ccttgaagtc actgccagtc tatacttcag gctgaggcca cttctgtct ttaaataatt 1334
caaactcaca aatcctgtgc ctgtctgtat gcaaatgtgg tcacgaatat tcaataaaaa 1394
tgcaaatgct atgct 1409

```

WO 02/00724

PCT/US01/20820

FIG. 2



WO 02/00724

PCT/US01/20820

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 toc 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 tgg 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

```

WO 02/00724

PCT/US01/20820

FIG. 3B

```

tgg cag aga ggc gag att cgg gat gcc tgt gca gag aca coa 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 cgg 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

```

WO 02/00724

PCT/US01/20820

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 tgg 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

```

WO 02/00724

PCT/US01/20820

FIG. 4B

```

tgg cag aga ggc gag att cgg gat gcc tgt gca gag aca cca acg oct 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

ott 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

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 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
370 375 380

```


WO 02/00724

PCT/US01/20820

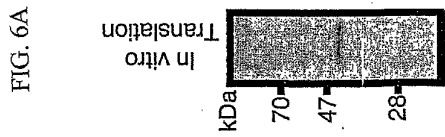
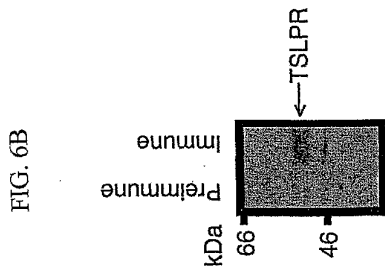
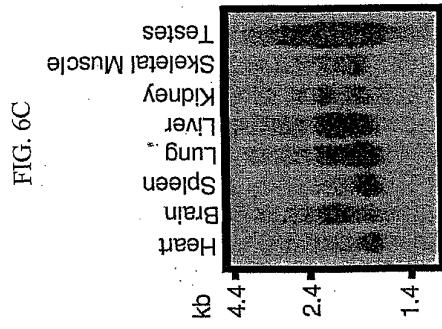
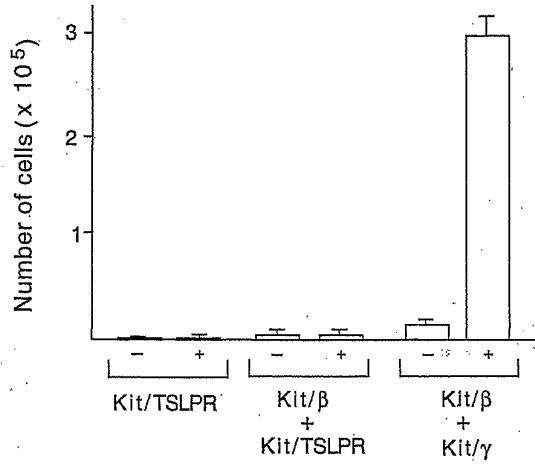


FIG. 7



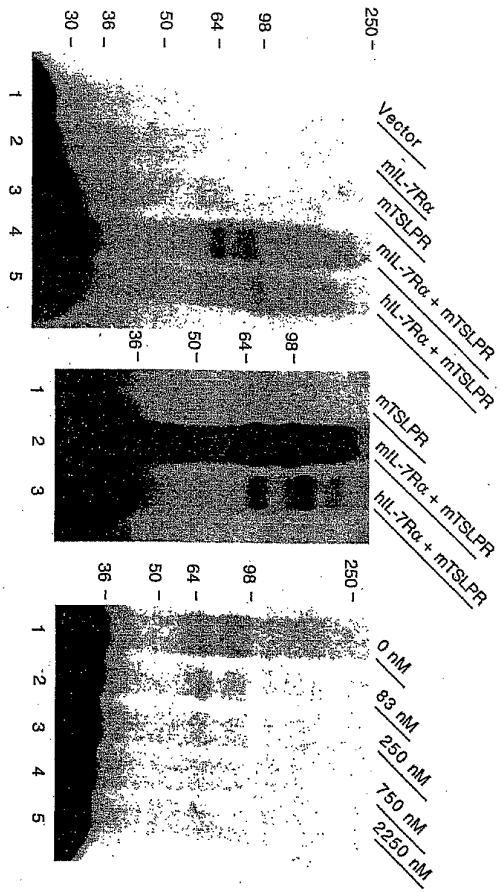


FIG. 8A

FIG. 8B

FIG. 8C

WO 02/00724

PCT/US01/20820

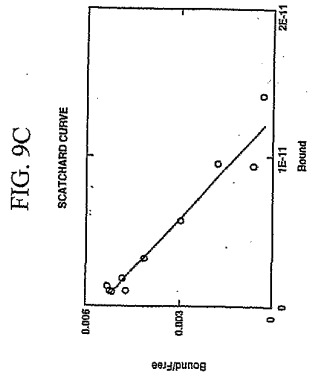
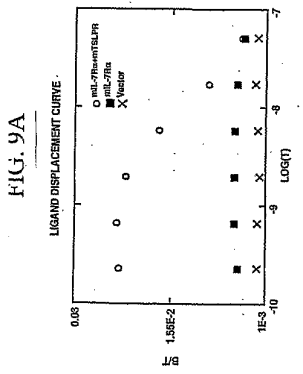
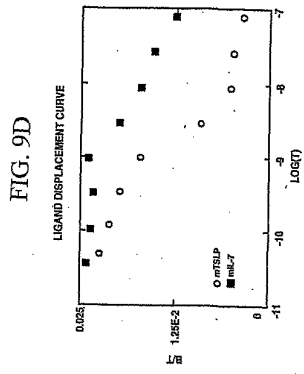
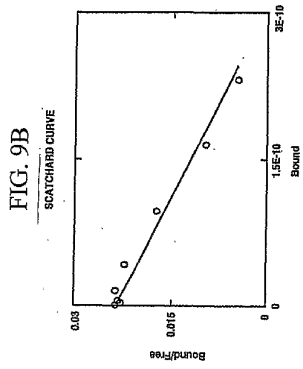
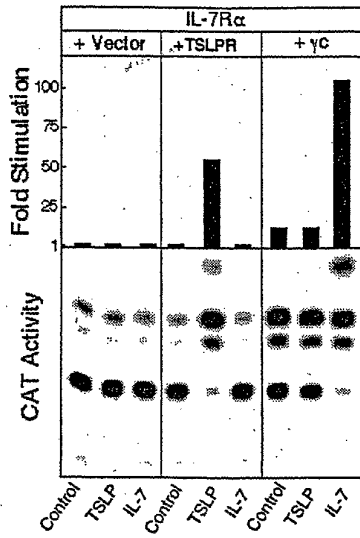


FIG. 10



WO 02/00724

PCT/US01/20820

SEQUENCE LISTING

<110> Saris, Chris
Chang, Ming-Shi

<120> Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor Molecules and
Uses Thereof

<130> 00-514-C

<140>

<141>

<150> 60/214,866

<151> 2000-06-28

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1409

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (162)..(1274)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (162)..(213)

<220>

<221> misc feature

<222> (891)..(953)

<223> Predicted transmembrane domain coding sequence

<400> 1

cccttcctc gccgaccct gacccegcc cgcocgcc acccagggc ccagacctga 60

ggggggccca ggtgcgggt gacgtcacag ggcggtgcc ccacccgtcc cgtggcctgg 120

acggacagag ctgagccagg gaataaccg cagatgctga 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 gty 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 gty gag gtc acg tgg gcc tcg gcc ccc gac cac cac agc gcc aac 320

Thr Val Glu Val Thr Trp Gly Ser Gly Pro Asp His His Ser Ala Asn

WO 02/00724

PCT/US01/20820

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	
ggc cca cct tgg aat gty 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 gty 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 gty sca 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 eta 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 eta 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 gty 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	

WO 02/00724

PCT/US01/20820

```

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 Ala Met Val Ser Val Gly Gly
345 350 355
gcc acg ttc atg gtg ggc gac agc gcc tac atg acc ctg tga 1274
Ala Thr Phe Met Val Gly Asp Ser Gly Tyr Met Thr Leu
360 365 370
cctggaagtc actgccagtc tatacttcag gctgaggcca cttcctgtct ttaataaatt 1334
caaaactcaca aatcctgtgc ctgtctgtat gcaaatgtgg tcacgaatat tcaataaaaa 1394
tgcaaatgct atgct 1409

<210> 2
<211> 370
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2
Met Ala Trp Ala Leu Ala Val Ile Leu Leu Pro Arg Leu Leu Ala Ala
1 5 10 15
Ala Ala Ala Ala Ala Val Thr Ser Arg Gly Asp Val Thr Val Val
20 25 30
Cys His Asp Leu Glu Thr Val Glu Val Thr Trp Gly Ser Gly Pro Asp
35 40 45
His His Ser Ala Asn Leu Ser Leu Glu Phe Arg Tyr Gly Thr Gly Ala
50 55 60
Leu Gln Pro Cys Pro Arg Tyr Phe Leu Ser Gly Ala Gly Val Thr Ser
65 70 75 80
Gly Cys Ile Leu Pro Ala Ala Arg Ala Gly Leu Leu Glu Leu Ala Leu
85 90 95
Arg Asp Gly Gly Gly Ala Met Val Phe Lys Ala Arg Gln Arg Ala Ser

```


WO 02/00724

PCT/US01/20820

<213> Mus musculus

<220>

<221> TRANSMEM

<222> {227}..(247)

<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

WO 02/00724

PCT/US01/20820

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
 290 300
 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
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

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

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(66)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (694)..(756)
 <223> Predicted transmembrane domain coding sequence

<400> 4
 atg ggg ggg 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 etc cag gaa ggt cac 240
 Asp Glu Ala Tyr Asp Gln Cys Thr Asn Tyr Leu Leu Gln Glu Gly His

WO 02/00724

PCT/US01/20820

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 ott 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
 <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 Gln 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 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

WO 02/00724

PCT/US01/20820

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
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> TRANSMEM
 <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

WO 02/00724

PCT/US01/20820

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

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

WO 02/00724

PCT/US01/20820

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
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Human
 TSLPR-FLAG

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1140)

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(66)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (694)..(756)
 <223> Predicted transmembrane domain coding sequence

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1114)..(1140)
 <223> FLAG coding sequence

<400> 7
 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

WO 02/00724

PCT/US01/20820

	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 gsc 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	
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

WO 02/00724

PCT/US01/20820

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 tit 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
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Human
TSLPR-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

WO 02/00724

PCT/US01/20820

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 Lys
 370 375

<210> 9
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Human
 TSLPR-FLAG

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

WO 02/00724

PCT/US01/20820

```

<220>
<221> DOMAIN
<222> (350)..(357)
<223> FLAG sequence

<400> 9
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
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

```

WO 02/00724

PCT/US01/20820

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

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Clone 9604927
 containing human TSLPR sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(68)

<223> Vector sequence

<220>

<221> sig_peptide

<222> (70)..(135)

<220>

<221> misc_feature

<222> (763)..(825)

<223> Predicted transmembrane domain coding sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (1186)..(1379)

<223> Vector sequence

<400> 10

ggatccacta gtaacggccg ccagtggtgt ggaattctgc agatatccat cacactggcg 60

gccgccacca tgggggggct ggttctgtgt tggggagctg cegtcttttt gctggggaggc 120

tggatggcct tggggcaagg aggagcagca gaaggagtac agattcagat catctaattc 180

aatttagaaa ccgtgcaggt gacatggaat gccagcaaat actccaggac caacctgact 240

ttccactaca gattoaacgg tgatgaggcc tatgaccagt gcaccaacta cttctccag 300

WO 02/00724

PCT/US01/20820

gaaggtcaca cttcaggggtg cctcctagac gcagagcagc gagacgacat tctctatttc 360
tccatcagga atgggagcga ccccgtttcc accgcaagtc gctggatggt ttattacctg 420
aaaccagttt cccogaagca cgtgagattt tctgggcatc aggatgcagt gacggtgacg 480
tgttttgacc tgtcctacgg ggtctcctc tatgaggttc agtaaccgag ccccttcgac 540
acogagtggc agtccaaaca ggaaaatacc tgcaacgtca ccatagaagg cttggatgcc 600
gagaagtgtt actctttctg ggtcagggty aaggctatgg aggatgtata tgggacagac 660
acatacccaa gogactggtc agaggtgaca tctgggcaga gaggcgagat tccggatgcc 720
tgtgcagaga caccaacgcc tcccaacca aagctgtcca aatttatttt aatttccagc 780
ctggccatcc ttctgatggt gctctcctc ottctgtctt tatgaaatt atggagagtg 840
aagaagtttc tcaattccag cgtgccagac ccgaaatcca tcttcccggg gctctttgag 900
atacaccaga ggaacttcca ggagtggatc acagacaccc agaactgtgc ccacctccac 960
aagatggcag gtgcagagca agaaagtggc cccgaggagc ccctggtagt ccagtggcc 1020
aagactgaag ccgagtctcc caggatctg gaccacaga ccgaggagaa agaggcctct 1080
gggggatccc tccagcttcc ccaccagccc ctccaaggcg gtgatgtggt cacaatcggg 1140
ggcttcaact ttgtgatgaa tgaccgtcc tacgtggcgt tgtgatctaa agggccctat 1200
tctatactgt cacctaaatg ctgagctcg ctgatcagcc tgcactgtgc cttctagtgt 1260
ccagcatct gtgttttgc cctccccgt gcttctctg acctggaat gtgccactcc 1320
cactgtcttt tcttaataaa atgaagaat tgcacccga ttgtctgagt aggtgtcta 1379

<210> 11
<211> 1415
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Clone 9508990
containing human TSLFR-FLAG sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(60)
<223> Vector sequence

<220>
<221> sig_peptide
<222> (62)..(127)

<220>

WO 02/00724

PCT/US01/20820

```

<221> misc_feature
<222> (755)..(817)
<223> Predicted transmembrane domain coding sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1175)..(1201)
<223> FLAG coding sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (1202)..(1415)
<223> Vector sequence

<400> 11
ggatccacta gtaacggcgg ccagtggtgt ggaattctgc agatatccat cacactggcc 60
catggggcgg ctggttctgc tgtgggggagc tgcogtcttt ctgctgggag gctggatggc 120
tttggggcaa gaggaggcag cagaaggagt acagattcag atcatctact tcaalttaga 180
aacctgacag gtgacatgga atgccagcaa atactccagg accaacctga ctttccacta 240
cagattcaac ggtgatgagg cctatgacca gtgcaaccaac tacctctctc aggaaggta 300
cacttcaggg tgcctcctag acgcagagca gcgagacgac attctctatt tctccatcag 360
gaatgggacg cccccggtt tcaccgcaag tcgctggatg gtttattacc tgaaacccag 420
ttcccgaag cactgagat ttctgtgca tcagatgca gtgacggtga cgtgttctga 480
cctgtcctac ggggatctcc tctatgaggt tcagtaccgg agccctctcg acaccgagtg 540
gcagtcocaa caggaaaata cctgcaactg caccatagaa ggcttggatg ccgagaagtg 600
tactcttctc tgggtcaggg tgaaggctat ggaggatgta tatgggcccag acacataccc 660
aagcactcgg tcagaggtga catgctggca gagagggcag attogggatg cctgtgcaga 720
gacccaacg cctcccaaac caaagctgtc caaatttatt ttaalttcca gcctggocat 780
cctctgatg gtgtctctcc tctctctgtc tttatggaaa ttatggagag tgaagaagtt 840
tctcattccc agcgtgccag acccgaatc catcttccc gggctcttg agatacaca 900
agggaaette caggagtgga tcaacagcac ccagaactg gcccaactcc acaagatggc 960
aggtgcagag caagaaagtg gccccgagga gccctggta gtcagtttg ccaagactga 1020
agccgagtct cccaggatgc tggaccaca gaccgaggag aaagaggcct ctgggggatc 1080
cctccagctt ccccaccagc cctccaagg cggatgatgt gtcacaatcg ggggottcae 1140
ctttgtgatg aatgaccgct cctacgtggc gttggactac aaggacgacg atgacaagta 1200
gtctagaggg coctattcta tagtgtcaac taaatgctag agctcgtgta tcagactcga 1260

```

WO 02/00724

PCT/US01/20820

ctgtgccttc tagttgcccag coactctgttg ttgcccctc ccccgctgcct tccttgacc 1320
 tggaaaggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaattgca tgcattgtc 1380
 tgagtaggtg tcattctatt ctggggggtg gcgtt 1415

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

<400> 12
 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

WO 02/00724

PCT/US01/20820

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
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 13
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg
 1 5 10

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Internalizing
 domain derived from HIV tat protein

<400> 14
 Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

WO 02/00724

PCT/US01/20820

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Type I
cytokine receptor conserved motif

<220>
<221> UNSURE
<222> {3}
<223> "Xaa" can be any naturally occurring amino acid

<400> 15
Trp Ser Xaa Trp Ser
1 5

<210> 16
<211> 5
<212> FRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Motif
replacing type I cytokine receptor conserved motif
in murine TSLPR polypeptide

<400> 16
Trp Thr Ala Val Thr
1 5

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/000724 A3

(51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/715, 16/18, A01K 67/027, A61K 38/16, C12N 15/86, 5/10, G01N 33/50 (74) Agent: NOONAN, Kevin; McDonnell Boehnen Hulbert & Bergholll, 300 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/20820

(22) International Filing Date: 28 June 2001 (28.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/214,866 28 June 2000 (28.06.2000) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 60/214,866 (CIP) Filed on 28 June 2000 (28.06.2000)

(71) Applicant (for all designated States except US): AMGEN, INC. [US/US]; One Amgen Center Drive, Mailstop 27-A-A, Thousand Oaks, CA 91320 (US).

(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): SARIS, Christiaan, M. [NL/US]; 4027 Colonnell Place, Newbury Park, CA 91320 (US); CHANG, Ming-Shi [US/—]; 3rd Floor, No.58 Tong-Ning Road, Taiwan (TW).

(81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published: with international search report

(88) Date of publication of the international search report: 3 January 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/000724 A3

(54) Title: THYMIC STROMAL LYMPHOPOIETIN RECEPTOR MOLECULES AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention provides Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor (TSLPR) polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention also provides selective binding agents, vectors, host cells, and methods for producing TSLPR polypeptides. The invention further provides pharmaceutical compositions and methods for the diagnosis, treatment, amelioration, and/or prevention of diseases, disorders, and conditions associated with TSLPR polypeptides.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PC1/US 01/20820
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FUJIO K ET AL: "MOLECULAR CLONING OF A NOVEL TYPE 1 CYTOKINE RECEPTOR SIMILAR TO THE COMMON GAMMA CHAIN" BLOOD, W.B. SAUNDERS, PHILADELPHIA, VA, US, vol. 95, no. 7, 1 April 2000 (2000-04-01), pages 2204-2211, XP000946169 ISSN: 0006-4971 figure 1	1-57
E	WO 02 00723 A (WHITEHEAD BIOMEDICAL INST ;BAUMANN HEINZ (US); FARR ANDREW G (US);) 3 January 2002 (2002-01-03) identical with present application.	1-57
P,X	PARK LINDA S ET AL: "Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, TOKYO, JP, vol. 192, no. 5, 4 September 2000 (2000-09-04), pages 659-669, XP002193895 ISSN: 0022-1007 figure 3	1-57

Form PCT/ISA4210 (continuation of second sheet) (July 1992)

International Application No. PCT/US 01 20820

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claim 49 is directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 33, 48, 53 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 2, 3, 14, 15, 18-32, 34, 35 (all partially)

Present claims 2, 3, 14, 15 relate to an extremely large number of possible molecules. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the molecules claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the full length of the SEQ ID N0s.

Present claims 18-32, 34, 35 relate to an extremely large number of possible selective binding agents. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the selective binding agents claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the specific antibody.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/20820**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.: 2, 3, 14, 15, 18-32, 34, 35 (all partially)
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims. It is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 information on patent family members

International Application No.
 PCT/US 01/20820

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9947538	A	23-09-1999	AU 3072799 A	11-10-1999
			AU 3451799 A	11-10-1999
			CA 2323761 A1	23-09-1999
			CA 2323776 A1	23-09-1999
			EP 1093457 A1	25-04-2001
			EP 1064297 A1	03-01-2001
			JP 2002506625 T	05-03-2002
			JP 2002506627 T	05-03-2002
			WO 9947538 A1	23-09-1999
			WO 9947540 A1	23-09-1999
			WO 0200723	A
WO 0200723 A2	03-01-2002			

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/715	C 0 7 K 14/715	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/28	C 0 7 K 16/28	4 C 0 8 4
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	4 H 0 4 5
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 15/00	F
	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 サリス, クリスチャー・ エム

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 2 0, ニューバリー パーク, コロネット プレイ
ス 4 0 2 7

(72) 発明者 チャン, ミン - シ

台湾 タイナン, トン - ニン ロード ナンバー 5 8, 3 アールディー フロア

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02
FB03
4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 DA03 DA06 HA11 HA17
4B029 AA07 FA12
4B063 QA01 QA06 QQ08 QQ79 QR48 QR77 QS33 QX02
4B064 AG20 AG27 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA26X AA91Y AA93X AA93Y AB01 CA24 CA44 CA46
4C084 AA01 AA07 AA17 BA01 BA02 BA08 BA22 DC50 NA14 ZB051
ZB071 ZC412
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA57 CA40 DA76 EA20 EA50
FA74

专利名称(译)	胸腺基质淋巴细胞生成素受体分子及其用途		
公开(公告)号	JP2004519205A	公开(公告)日	2004-07-02
申请号	JP2002505846	申请日	2001-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司		
申请(专利权)人(译)	安进公司		
[标]发明人	サリスクリスチャーエム チャンミンシ		
发明人	サリス, クリスチャーエム チャン, ミンシ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K45/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/715 C07K16/28 C07K19/00 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/715 C07K14/7155 C07K2319/00 C12N2799/021 C07K16/2866		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K45/00 A61P37/02 A61P43/00.105 A61P43/00.111 C07K14/715 C07K16/28 C07K19/00 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A C12N15/00.F A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/HA11 4B024/HA17 4B029/AA07 4B029/FA12 4B063/QA01 4B063/QA06 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QX02 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA91Y 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB051 4C084/ZB071 4C084/ZC412 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA57 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	井上充 小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	60/214866 2000-06-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了胸腺基质淋巴细胞生成素受体 (TSLPR) 多肽和编码其的核酸分子。本发明还提供了选择性结合剂, 载体, 宿主细胞和用于产生TSLPR多肽的方法。本发明还提供用于诊断, 治疗, 改善和/或预防与TSLPR多肽相关的疾病, 病症和病症的药物组合物和方法。

元の残基	例示的置換	好ましい置換
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, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ酪酸, 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
Tyr	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu