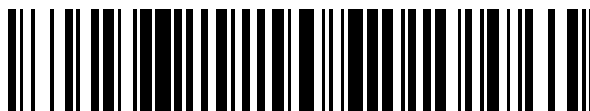


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 879**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/54** (2006.01)  
**C07K 16/24** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 15/24** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**A61K 38/20** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2002 E 02793761 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 1417231**

54 Título: **Linfopoyetina estromal tímica humana modificada**

30 Prioridad:

**23.07.2001 US 307345 P**

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

**16.09.2013**

73 Titular/es:

**IMMUNEX CORPORATION (100.0%)  
ONE AMGEN CENTER DRIVE  
THOUSAND OAKS, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**LYMAN, STEWART D.;  
VAN NESS, KIRK P. y  
PAXTON, RAYMOND J.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 422 879 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Linfopoyetina estromal tímica humana modificada

### **Remisión a solicitudes relacionadas**

5 La presente solicitud reivindica por la presente el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos número de serie 60/307.345, presentada el 23 de julio de 2001.

### **Antecedentes de la invención**

#### **Campo de la invención**

10 La invención se refiere, en general, a la expresión de proteínas recombinantes. Más específicamente, la invención se refiere a polipéptidos de linfopoyetina estromal tímica (TSLP) humana recombinante modificada que son resistentes a degradación en cultivo celular de mamífero, a secuencias polinucleotídicas que codifican polipéptidos TSLP modificados, y a procedimientos para la producción y uso de TSLP.

#### **Descripción de la técnica relacionada**

15 La linfopoyetina estromal tímica (TSLP) es un factor de crecimiento integral del desarrollo y maduración tanto de linfocitos B como de linfocitos T. En particular, TSLP murina soporta la linfopoyesis B y es necesaria para la proliferación de linfocitos B. TSLP murina también es crítica en el control del reordenamiento del locus del receptor gamma para linfocitos T (TCR $\gamma$ ), y tiene un efecto estimulador sustancial sobre timocitos y linfocitos T maduros. Véase, por ejemplo, Friend y col., 1994, Exp. Hematol., 22:321-328; Ray y col., 1996, Eur. J. Immunol., 26:10-16; Candeias y col., 1997, Immunology Letters, 57:9-14.

20 TSLP tiene actividad citoquina similar a IL-7. Por ejemplo, TSLP puede reemplazar a IL-7 en la estimulación de las respuestas de proliferación de linfocitos B (Friend y col., *supra*). Parece que TSLP e IL-7 median sus efectos linfopoyéticos mediante distintos mecanismos. Por ejemplo, IL-7 activa las tirosina quinasas de la familia Janus, incluyendo JAK1 y JAK3, y modula la actividad de la proteína transductora de señales y activadora de la transcripción 5 (STAT5). Aunque TSLP modula la actividad de STAT5, no logra activar ningún miembro de la familia Janus de tirosina quinasas (Levin y col., 1999, J. Immunol. 162:677-683). Aunque TSLP e IL-7 median efectos similares sobre células diana, también parecen tener distintas vías de señalización y probablemente alguna variación en su respuesta biológica.

25 Las actividades conocidas de TSLP en la modulación del sistema inmune, particularmente en la estimulación de la proliferación, desarrollo y maduración de linfocitos B y T, hace de esta molécula una herramienta terapéutica atractiva. La capacidad de producir grandes cantidades del polipéptido activo es esencial para la producción comercial de TSLP humana. La producción de polipéptidos recombinantes en un sistema de expresión de células de mamífero se usa más habitualmente para aplicaciones terapéuticas humanas comerciales.

30 El polipéptido huTSLP recombinante se ha expresado en varios sistemas de expresión diferentes, incluyendo líneas celulares de mamífero, como se describe en el documento WO 00/29581. Sin embargo, la producción de cantidades útiles de proteína huTSLP activa en células de mamífero ha sido difícil. En particular, la expresión de huTSLP en células de mamífero a menudo produce un producto degradado. Se necesitan moléculas polinucleotídicas alternativas y procedimientos para conseguir la producción de cantidades útiles de polipéptido huTSLP activo.

#### **Sumario de la invención**

35 Se comprobó que la secuencia de aminoácidos de TSLP humana contiene una secuencia única de aminoácidos que contiene un sitio de escisión por furina. Las modificaciones de los polipéptidos para inactivar el sitio de escisión por furina, de acuerdo con la presente invención, proporcionan polipéptidos huTSLP resistentes a proteasa modificados que son más estables cuando se expresan en sistemas de células de mamífero en comparación con los polipéptidos TSLP no modificados.

40 Los polipéptidos TSLP humanos resistentes a proteasa modificados de la invención, incluyen aquellos que tienen una o más modificaciones de secuencia de aminoácidos que alteran e inactivan el sitio de escisión por furina RRKRK, como se muestra en la siguiente Tabla 1, posicionado en aproximadamente los restos de aminoácidos 127-131 de la SEC ID N° 4. Las modificaciones adecuadas incluyen sustituciones, deleciones, adiciones o combinaciones de estas de aminoácidos, que alteran la secuencia de aminoácidos RRKRK para alterar el patrón del sitio de escisión por furina RXXR, en particular aquellos que alteran el patrón RX(R/K)R. También se incluyen polipéptidos que son sustancialmente similares en la secuencia de aminoácidos a los polipéptidos huTSLP modificados, y fragmentos de los mismos, que retienen una actividad deseada de TSLP nativa y son resistentes a proteasa. En una realización, las secuencias RKRK o RKRKV se han delecionado de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos huTSLP.

45 La invención también proporciona moléculas polinucleotídicas que codifican los polipéptidos huTSLP resistentes a proteasa modificados analizados anteriormente. Las moléculas polinucleotídicas de la invención incluyen aquellas

que tienen una modificación de secuencia de ácido nucleico en fase que altera o desactiva de otro modo los codones que codifican el sitio de escisión por furina RRKRK [SEC ID N° 6] posicionado en los restos de aminoácidos 127-131 de la SEC ID N° 4. Las modificaciones adecuadas del sitio de escisión incluyen sustituciones, deleciones, adiciones o combinaciones de estas en fase del ácido nucleico, que alteran la secuencia de ácido nucleico que codifica RRKRK para alterar el patrón del sitio de escisión por furina codificado RXXR, particularmente RX(R/K)R. Las realizaciones incluyen, por ejemplo, mutantes de deleción en los que se ha delecionado la secuencia de nucleótidos AGG AGA AAA AGG AAA [SEC ID N° 5] que codifica RRKRK, o la secuencia de nucleótidos AGA AAA AGG AAA GTC [SEC ID N° 7] que codifica una secuencia de aminoácidos RKRKV [SEC ID N° 8]. También se incluyen moléculas polinucleotídicas que tienen secuencias que son sustancialmente similares a las moléculas polinucleotídicas que codifican los polipéptidos TSLP modificados, y fragmentos de los mismos que retienen una actividad deseada de TSLP nativa y son resistentes a proteasa.

La invención también proporciona formas adicionales de polipéptidos huTSLP modificados, incluyendo formas solubles y proteínas de fusión. Por ejemplo, las proteínas de fusión de la invención incluyen polipéptidos huTSLP modificados fusionados a proteínas o péptidos heterólogos que confieren una función deseada, tal como para facilitar la purificación, oligomerización, estabilidad, secreción o identificación del polipéptido. Una proteína de fusión de la invención puede producirse, por ejemplo, a partir de una construcción de expresión que contiene una molécula polinucleotídica que codifica el polipéptido huTSLP resistente a proteasa modificado en fase con una molécula polinucleotídica que codifica la proteína heteróloga.

La invención también proporciona vectores, plásmidos, sistemas de expresión, células huésped, y similares, que contienen una molécula polinucleotídica modificada de huTSLP resistente a proteasa. Los procedimientos de ingeniería genética para la producción de polipéptidos huTSLP modificados de la invención incluyen expresión de las moléculas polinucleotídicas en sistemas sin células, huéspedes celulares, en tejidos, y en modelos animales, de acuerdo con procedimientos conocidos.

La invención incluye adicionalmente composiciones que contienen un polipéptido huTSLP modificado sustancialmente purificado de la invención y un vehículo aceptable. Se prefieren composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración a células, tejidos, o pacientes, que son útiles para inducir las actividades de linfocitos B y linfocitos T en tratamiento terapéutico, por ejemplo, de trastornos inmunodeficiarios, infecciones víricas, e infecciones bacterianas.

Estas y otras diversas características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la lectura de la siguiente descripción detallada y una revisión de las reivindicaciones adjuntas.

### **Breve descripción de las secuencias**

La SEC ID N° 1 es una secuencia polinucleotídica que codifica una TSLP murina (GenBank AF232937).

La SEC ID N° 2 es la secuencia de aminoácidos de TSLP murina codificada por la SEC ID N° 1.

La SEC ID N° 3 es una secuencia polinucleotídica que codifica una TSLP humana (GenBank AY037115).

La SEC ID N° 4 es la secuencia de aminoácidos de una TSLP humana codificada por la SEC ID N° 3.

La SEC ID N° 5 es una secuencia polinucleotídica AGG AGA AAA AGG AAA, que codifica un sitio de escisión por furina RRKRK.

La SEC ID N° 6 es la secuencia de aminoácidos RRKRK codificada por la SEC ID N° 5.

La SEC ID N° 7 es una secuencia polinucleotídica AGA AAA AGG AAA GTC, que codifica una secuencia de aminoácidos RKRKV presente en TSLP humana pero no en TSLP murina.

La SEC ID N° 8 es la secuencia de aminoácidos RKRKV codificada por la SEC ID N° 7.

La SEC ID N° 9 es una secuencia polinucleotídica que codifica una TSLP humana modificada que tiene una o más modificaciones en fase de la secuencia AGG AGA AAA AGG AAA que codifica el sitio de escisión por furina RRKRK, provocando la desactivación del sitio de escisión por furina codificado.

La SEC ID N° 10 es la secuencia de aminoácidos de la TSLP modificada codificada por la SEC ID N° 9.

La SEC ID N° 11 es una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido TSLP modificado que tiene los codones AGA AAA AGG AAA que codifican los aminoácidos RKRK delecionados.

La SEC ID N° 12 es la secuencia de aminoácidos del polipéptido TSLP modificado codificado por la SEC ID N° 11.

La SEC ID N° 13 es una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido TSLP modificado que tiene los codones AGG AGA AAA AGG AAA que codifican los aminoácidos RRKRK delecionados.

La SEC ID N° 14 es la secuencia de aminoácidos del polipéptido TSLP modificado codificado por la SEC ID N° 13.

La SEC ID N° 15 es una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido TSLP modificado que tiene los codines AGA AAA AGG AAA GTC que codifican los aminoácidos RKRKV deletados.

La SEC ID N° 16 es la secuencia de aminoácidos del polipéptido TSLP modificado codificado por la SEC ID N° 15.

5 La SEC ID N° 17 es un polipéptido TSLP humano modificado.

La SEC ID N° 18 es un polipéptido TSLP humano modificado.

La SEC ID N° 19 es un cebador directo para PCR.

La SEC ID N° 20 es un cebador directo para PCR.

La SEC ID N° 21 es un cebador inverso para PCR.

10 La SEC ID N° 22 es un cebador inverso para PCR.

### **Descripción detallada de la invención**

Definiciones:

Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la comprensión de ciertos términos usados frecuentemente en el presente documento y no pretender limitar el ámbito de la presente divulgación.

15 "Aminoácido" se refiere a cualquiera de los veinte  $\alpha$ -aminoácidos convencionales así como a cualquier derivado de origen natural y sintético. Pueden existir modificaciones en aminoácidos o secuencias de aminoácidos durante los procesos naturales tales como procesamiento post-transcripcional, o pueden incluir modificaciones químicas conocidas. Las modificaciones incluyen, aunque sin limitación: fosforilación, ubiquitinación, acetilación, amidación, glucosilación, unión covalente de flavina, ADP-ribosilación, reticulación, yodación, metilación, y similares.

20 Como se usa en el presente documento el término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos intactos que incluyen anticuerpos policlonales (véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane (eds), Cold Spring Harbor Press, (1988)), y anticuerpos monoclonales (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° RE 32.011, 4.902.614, 4.543.439, y 4.411.993, y Monoclonal Antibodies: A New Dimension in Biological Analysis, Plenum Press, Kennett, McKearn y Bechtol (eds.) (1980)). El término "anticuerpo" también se refiere a un fragmento de un anticuerpo tal como F(ab), F(ab'), F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fc, y anticuerpos de cadena sencilla que se producen por técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. El término "anticuerpo" también se refiere a anticuerpos biespecíficos o bifuncionales, que son un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos diferentes pares de cadenas pesada/ligera y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una diversidad de procedimientos incluyendo fusión de hibridomas o ligamiento de fragmentos F(ab'). (Véanse Songvilai y col., 1990, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321, Kostelny y col., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553). Como se usa en el presente documento el término "anticuerpo" también se refiere a anticuerpos quiméricos, es decir, anticuerpos que tienen un dominio de inmunoglobulina de anticuerpo constante humano acoplado a uno o más dominios de inmunoglobulina de anticuerpo variable no humano, o fragmentos de los mismos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.595.898 y la patente de Estados Unidos N° 5.693.493). Anticuerpos también se refiere a anticuerpos "humanizados" (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.816.567 y el documento WO 94/10332), minicuerpos (documento WO 94/09817), y anticuerpos producidos por animales transgénicos, en los cuales un animal transgénico que contiene una parte de los genes que producen anticuerpo humano pero deficiente en la producción de anticuerpos endógenos es capaz de producir anticuerpos humanos (véanse, por ejemplo, Mendez y col., 1997, Nature Genetics 15:146-156, y la patente de Estados Unidos N° 6.300.129). El término "anticuerpos" también incluye anticuerpos multiméricos, o un complejo de mayor orden de proteínas tales como anticuerpos heterodiméricos. "Anticuerpos" también incluye anticuerpos anti-idiotípicos incluyendo anticuerpos anti-idiotípicos contra un anticuerpo dirigido al antígeno tumoral gp72; un anticuerpo contra el gangliósido GD3; o un anticuerpo contra el gangliósido GD2.

45 "Fc" o "polipéptido Fc" se refiere a polipéptidos que contienen el dominio Fc de un anticuerpo. El "dominio Fc" se refiere a la parte del anticuerpo que es responsable de unirse a receptores de anticuerpo en las células. Un dominio Fc puede contener uno, dos o todos los siguientes: el dominio pesado constante 1 (C<sub>H1</sub>), el dominio pesado constante 2 (C<sub>H2</sub>), el dominio pesado constante 3 (C<sub>H3</sub>), y la región bisagra. El dominio Fc de la IgG1 humana, por ejemplo, contiene el dominio C<sub>H2</sub>, y el dominio C<sub>H3</sub> y la región bisagra, pero no el dominio C<sub>H1</sub>. También se incluyen formas truncadas de dichos polipéptidos que contienen la región bisagra que promueve la dimerización. Véase, por ejemplo, C. A. Hasemann y J. Donald Capra, Immunoglobins: Structure and Function, en William E. Paul, ed. Fundamental Immunology, Segunda Edición, 209, 210-218 (1989).

"Antisentido" se refiere a secuencias polinucleotídicas que son complementarias a secuencias polinucleotídicas "con sentido" diana.

"Resto de direccionamiento celular" se refiere a cualquier señal en un polipéptido, de origen natural o diseñada por ingeniería genética, usado para dirigir a un polipéptido a una célula, polipéptido, polinucleótido o material innato.

"Complementario" o "complementariedad" se refiere a la capacidad de un polinucleótido en una molécula polinucleotídica de formar un par de bases con otro polinucleótido en una secuencia molécula polinucleotídica. Por ejemplo, la secuencia A-G-T es complementaria a la secuencia T-C-A. La complementariedad puede ser parcial, en la cual solamente algunos de los polinucleótidos coinciden de acuerdo con el apareamiento de bases, o completa, donde todos los polinucleótidos coinciden de acuerdo con el apareamiento de bases.

Como se usa en el presente documento, el término "derivado" se refiere a polipéptidos TSLP resistentes modificados unidos a al menos un resto químico adicional, o a al menos un polipéptido adicional para formar un conjugado covalente o agregado tal como grupos glucosilo, lípidos, fosfato, grupos acetilo, o proteínas de fusión C-terminales o N-terminales y similares.

"Expresión" se refiere a la transcripción y traducción que sucede dentro de una célula huésped. El nivel de expresión de una molécula de ADN en una célula huésped puede determinarse en base a la cantidad de ARNm correspondiente que está presente dentro de la célula o a la cantidad de proteína codificada por la molécula de ADN producida por la célula huésped. (Sambrook y col., 1989, Molecular cloning: A Laboratory Manual, 18.1-18.88).

Como se usa en el presente documento, la expresión "sitio de escisión por furina" se refiere a una secuencia de aminoácidos reconocida y escindida por furina. En TSLP humana, por ejemplo, se ha identificado un sitio de escisión por furina dentro de la secuencia RRKRK. En general, el sitio de escisión mínimo para la furina es RXXR y más preferentemente, RX(R/K)R. (Nakayama 1997, Biochem J 327:625-35). El término "furina" se refiere a una serín proteasa dependiente de calcio que está implicada en el procesamiento de una diversidad de proteínas. Se sabe que la furina escinde diversas proproteínas, tales como precursores del factor de crecimiento, en proteínas biológicamente activas. Se ha detectado ARNm de furina en todos los tejidos y líneas celulares examinados, lo que sugiere que su actividad es ubicua y no está centrada en ningún grupo diana particular de proteínas. Ejemplos de preproteínas escindidas por furina incluyen diversos factores de crecimiento, receptores del factor de crecimiento, proteínas plasmáticas implicadas en la coagulación sanguínea y cascadas del complemento, metaloproteinasas de matriz, glucoproteínas de envuelta viral, y exotoxinas bacterianas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "polipéptidos TSLP modificados" o "polipéptidos huTSLP modificados" se usa de forma intercambiable con "TSLP resistente a furina" o "TSLP resistente a proteasa" y se refiere a cualquier polipéptido huTSLP que se haya modificado para inactivar el sitio de escisión por furina RXXR, y que también retiene una actividad TSLP, tal como estimulación de proliferación o desarrollo de linfocitos B o T, o unión a receptores de TSLP, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/29581, o en los siguientes ejemplos. La expresión "polipéptidos TSLP modificados" también incluye variantes y fragmentos tales como el dominio extracelular, así como derivados tales como proteínas de fusión.

"Proteína de fusión" se refiere a una proteína que tiene un polipéptido heterólogo unido mediante técnicas de ADN recombinante. El polipéptido heterólogo fusionado puede proporcionar una función específica, por ejemplo, para determinar la localización de la proteína de fusión en una célula, potenciar la estabilidad de la proteína de fusión, facilitar la purificación de la proteína de fusión, o dirigir la proteína a un antígeno o célula deseada. Ejemplos de dichas proteínas de fusión incluyen polipéptidos fusionados a una parte de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, un fragmento Fc, polipéptidos fusionados a una marca histidina, un factor de crecimiento, y similares, como se describe, en el documento WO 00/29581.

"Modificado por ingeniería genética" se refiere a cualquier procedimiento recombinante usado para crear una célula huésped eucariota que exprese una proteína de interés. Los procedimientos y vectores para modificar por ingeniería genética células huésped son bien conocidos; por ejemplo, se ilustran diversas técnicas en Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel y col., eds. (Wiley y Sons, New York, 1988, y actualizaciones trimestrales). Las técnicas de ingeniería genética incluyen, aunque sin limitación, vectores de expresión, recombinación homóloga dirigida y activación génica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.272.071 de Chappel) y transactivación por factores de transcripción modificados (véase, por ejemplo, Segal y col., 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96(6):2758-63).

"Homología" se refiere a un grado de complementariedad entre polinucleótidos, donde el grado de complementariedad entre moléculas polinucleotídicas tiene efectos significativos sobre la eficacia y potencia de la hibridación entre las moléculas polinucleotídicas.

"Célula huésped" o "células huésped" se refiere a células establecidas en cultivo *ex vivo*. Es una característica de las células huésped analizadas en la presente divulgación que son capaces de expresar TSLP resistente a furina, como se define en el presente documento. Ejemplos de células huésped adecuadas útiles para aspectos de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, líneas celulares de mamífero. Ejemplos específicos de dichas líneas celulares incluyen células renales embrionarias humanas (células 293), células de ovario de hámster chino (CHO) (Puck y col., 1958, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60, 1275-1281), células de carcinoma cervical humano (HELA) (ATCC CCL 2), células hepáticas humanas (Hep G2) (ATCC HB8065), células cancerosas de mama humana (MCF-7)

(ATCC HTB22), células de carcinoma de colon humano (DLD-1) (ATCC CCL 221), células Daudi (ATCC CRL-213), células COS, y células CV-1.

5 "Hibridación" se refiere al apareamiento de polinucleótidos complementarios durante un periodo de atemperado. La fuerza de hibridación entre dos moléculas polinucleótidas se ve influenciada por la homología entre las dos moléculas, la rigurosidad de las condiciones implicadas, la temperatura de fusión del híbrido formado, y la proporción G:C dentro de los polinucleótidos.

10 "Inactivado" se refiere a una actividad que se ha vuelto no funcional. Por ejemplo, un sitio de escisión por furina en un polipéptido puede inactivarse modificando la secuencia de aminoácidos. La escisión del polipéptido modificado en presencia de furina se reduce, y preferentemente se elimina, en comparación con el polipéptido de tipo silvestre. La escisión reducida o eliminada se demuestra, por ejemplo, por un cambio en los productos de escisión en comparación con los productos de escisión del tipo silvestre.

"Aislado" se refiere a un polinucleótido o polipéptido que se ha separado de al menos un contaminante (polinucleótido o polipéptido) con el cual está normalmente asociado. Por ejemplo, un polinucleótido aislado está en un contexto o en una forma que es diferente de la que se encuentra en la naturaleza.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "polipéptido huTSLP" se refiere a un polipéptido TSLP humano que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 4, o una variante o fragmento de ese polipéptido que retiene al menos una actividad de una TSLP que tiene la SEC ID N° 4. Una variante es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos de la proteína inalterada, o un fragmento de la misma. Para los propósitos de la presente invención, "sustancialmente similar" a es al menos aproximadamente un 80% idéntica a, preferentemente al menos aproximadamente un 90% idéntica a, más preferentemente al menos aproximadamente un 95%, más preferentemente al menos aproximadamente un 98%, mucho más preferentemente al menos aproximadamente un 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína inalterada, y que retiene la actividad del polipéptido inalterado. Las sustituciones de aminoácidos que son sustituciones conservativas que probablemente no afectan a la actividad biológica se consideran idénticas para los propósitos de la presente invención e incluyen las siguientes: Ala para Ser, Val para Ile, Asp para Glu, Thr para Ser, Ala para Gly, Ala para Thr, Ser para Asn, Ala para Val, Ser para Gly, Tyr para Phe, Ala para Pro, Lys para Arg, Asp para Asn, Leu para Ile, Leu para Val, Ala para Glu, Asp para Gly, y las inversas. (Véase, por ejemplo, Neurath y col., *The Proteins*, Academic Press, New York (1979)).

30 El porcentaje de identidad puede determinarse por inspección visual y cálculo matemático, o por una comparación de dos secuencias usando diversos programas informáticos por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de dos secuencias puede determinarse usando el programa informático GAP, basado en el algoritmo de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482-489 (1981), (disponible en la University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG), University Research Park, Madison, Wisconsin). Los parámetros por defecto preferidos para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de valoración, *blosum62*, como se describe por Henikoff y Henikoff *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:10915 (1992); un valor de hueco de 12; (3) un valor de longitud de hueco de 4; y (4) sin penalización para huecos finales. También pueden usarse otros programas usados por los especialistas en la técnica de comparación de secuencias.

40 "Polinucleótido" se refiere a una secuencia de nucleótidos. Los nucleótidos son una secuencia de polirribonucleótidos o polidesoxirribonucleótidos, o una mezcla de ambos. Los ejemplos de polinucleótidos en el contexto de la presente invención incluyen ADN mono y bicatenario, ARN mono y bicatenario, y moléculas híbridas que tienen tanto mezclas de ADN como de ARN mono y bicatenario. Además, los polinucleótidos de la presente invención pueden incluir uno o más nucleótidos modificados.

45 Como se usa en el presente documento el término "proteína" y "polipéptido" se usan de forma intercambiable y se considera que son cualquier cadena de al menos diez aminoácidos ligada por enlaces peptídicos. La purificación de una proteína de las proteínas contaminantes puede conseguirse a través de cualquiera de varias técnicas conocidas incluyendo, precipitación con sulfato de amonio o etanol, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxilapatita, y cromatografía en lectina. Se ilustran diversas técnicas de purificación de proteínas en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel y col., eds. (Wiley y Sons, Nueva York, 1988, y actualizaciones trimestrales).

50 "STAT5" se refiere a un miembro de los transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT) de la familia de factores de transcripción que se sabe que se activan por una o más JAK quinasas, se traslocan al núcleo, y participan en la regulación transcripcional uniéndose a sitios específicos del ADN. Las técnicas para determinar la actividad STAT5 incluyen ensayos de unión a ADN, ensayos indicadores dependientes de STAT5, marcaje con <sup>32</sup>P de STAT5, y similares, como se ilustra en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel y col., eds. (Wiley y Sons, Nueva York, 1988, y actualizaciones trimestrales).

"Linfopoyetina estromal tímica" (TSLP) se refiere a un factor de crecimiento que estimula el proceso de desarrollo hematolinfoide, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/29581, y Sims y col., 2000, *J. Exp. Med.* 192:671-680.

"Vector", "vector extracromosómico", o "vector de expresión" se refiere a una primera molécula polinucleotídica, habitualmente bicatenaria, que puede tener insertada en la misma una segunda molécula polinucleotídica, por ejemplo un polinucleótido heterólogo, tal como un polinucleótido que codifica TSLP humana resistente a furina. Un polinucleótido heterólogo puede hallarse o no de forma natural en la célula huésped, y puede ser una o más adicionales de una secuencia de ácido nucleico presente de forma natural en el genoma huésped. El vector transporta el polinucleótido foráneo al interior de una célula huésped adecuada. Una vez en la célula huésped, el vector puede ser capaz de integrarse en los cromosomas de la célula huésped. El vector también puede contener los elementos necesarios para seleccionar células que contienen el polinucleótido integrado, así como elementos para promover la transcripción de ARNm desde el polinucleótido transfectado. Ejemplos de vectores dentro del alcance de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, plásmidos, bacteriófagos, cósmidos, retrovirus, y cromosomas artificiales.

Salvo que se indique de otro modo, las técnicas utilizadas pueden hallarse en cualquiera de varias referencias bien conocidas, tales como: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook y col. (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual), *Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, Vol. 185, editado por D. Goeddel, 1991 Academic Press, San Diego, CA)*, "Guide to Protein Purification" in *Methods in Enzymology (M.P. Deutscher, 3ª., (1990) Academic Press, Inc.)*, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis y col. (1990) Academic Press, San Diego, CA)*, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2ª ed. (R.I. Freshney (1987) Liss, Inc., New York, NY)*, y *Gene Transfer and Expression Protocols*, pág. 109-128, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N.J.).

## 20 Polipéptidos TSLP

La linfopoyetina estromal tímica (TSLP) es un factor de crecimiento, un miembro de la familia de citoquinas de factores de señalización linfopoyéticos que es integral al desarrollo tanto de linfocitos B como de linfocitos T y su maduración. TSLP promueve la linfopoyesis de linfocitos B en la fase de linfocito B inmaduro B220<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup> e induce la proliferación de la línea celular dependiente de factor NAGB/7. TSLP está implicada en el control del reordenamiento del locus de receptor gamma de células T (TCR $\gamma$ ), y tiene un efecto estimulador sustancial sobre timocitos y linfocitos T maduros.

Las actividades biológicas de TSLP sobre linfocitos B y T solapa parcialmente con las actividades de la citoquina IL-7. Por ejemplo, tanto TSLP como IL-7 co-estimulan los timocitos y linfocitos T maduros, sostienen la línea celular NAG8/7, y soportan la linfopoyesis B en células hepáticas fetales. Estas funciones solapantes probablemente son el resultado del uso común por los complejos receptores de TSLP e IL-7 de la cadena alfa IL-7R (Park y col., 2000, *J. Experimental Medicine*, 192(5):659-669; Levin et al., 1999, *J. Immunol.*, 162(2):677-83; Isaksen et al., 1999, *J. Immunol.*, 163(11):5971-7). El bloqueo del receptor de IL-7 probablemente bloqueará las actividades tanto de IL-7 como de TSLP.

IL-7, junto con IL-15, es importante para el desarrollo y función de las células inmunes, linfocitos B y T. IL-7 ayuda al desarrollo de linfocitos T CD4 y CD8 así como en la proliferación y supervivencia de linfocitos T CD4 vírgenes y de memoria. IL-15 es importante para el desarrollo de linfocitos citolíticos naturales (NK), y está implicada en el desarrollo de células CD8 de memoria pero no células CD4 de memoria.

Usando un modelo de ratón IL-15 knockout y un anticuerpo dirigido contra la cadena alfa del receptor de IL-7, se determinó que IL-7 pero no IL-15 es necesaria para la proliferación de linfocitos T CD8 vírgenes, incluyendo células OTI TgT e lo policlonal CD 44. La proliferación dirigida por homeostasis aguda (HDP) de linfocitos T CD8 de memoria (OTI o hi policlonal CD44) está retardada en ratones IL-15 KO y por tratamiento de ratones de tipo silvestre con anticuerpo monoclonal anti-receptor de IL-7. En ausencia de IL-15 e inhibición de la función del receptor de IL-7, la proliferación de linfocitos T de memoria está casi completamente inhibida. La proliferación homeostática basal de linfocitos T de memoria CD8 está bloqueada en ratones IL-15 KO. El tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-receptor de IL-7 retardaba la proliferación en ratones de tipo silvestre. En ausencia de IL-15 y bajo la inhibición de la función del receptor de IL-7, está afectada la supervivencia de los linfocitos T. estos resultados indican que IL-7 e IL-15 son esenciales para la proliferación y supervivencia de linfocitos T de memoria CD8. Como TSLP e IL-7 comparten actividades funcionales solapantes sobre linfocitos T mediante el receptor de IL-7, se anticipa que TSLP también funciona promoviendo la proliferación y supervivencia de linfocitos T de memoria CD8. Los datos de linfocitos T de memoria indican que TSLP es útil para obtener inmunidad a largo plazo, y por tanto puede usarse como adyuvante de vacuna.

Más particularmente, TSLP soporta la proliferación y diferenciación de progenitores de linfocitos B B220<sup>+</sup> comprometidos *in vitro* (Ray, y col., 1996, *Eur. J. Immunol.* 26:10-16). Las células incubadas en presencia de IL-7 o TSLP expresan marcadores de superficie celular característicos de la fase pro linfocito B de diferenciación de linfocitos B. TSLP puede reemplazar a IL-7 durante los primeros 4-6 días de cultivo *in vitro* para soportar el progreso de los progenitores de linfocitos B desde precursores bipotenciales no comprometidos. TSLP también puede sustituir a IL-7 en el soporte de la respuesta proliferativa sostenida mostrada por progenitores de linfocitos B de ratones CBA/N. TSLP soporta la expansión de células pre B B220<sup>+</sup> desde hígado fetal o médula ósea durante varios días *in vitro*. TSLP también facilita la proliferación y diferenciación de células pre B aisladas de médula ósea hasta la fase de comenzar a ser sensibles a mitógenos en presencia de la línea celular estromática S 17.

TSLP facilita la expresión y diferenciación de progenitores de linfocitos B *in vitro*, y puede reemplazar a IL-7 en el soporte del desarrollo de linfocitos B a partir de precursores B220<sup>+</sup> así como progenitores bipotenciales no comprometidos *in vitro*. Las técnicas para estimular la proliferación celular de linaje B y linaje T son bien conocidas (Ray y col., 1996 *supra*; Namikawa y col., 1996, Blood 87:1881-1890), así como técnicas para expandir células hematopoyéticas a partir de fuentes tales como sangre de cordón umbilical y médula ósea (W. Piacibello, y col., 1997, Blood, 89(8):2644-2653). TSLP, sola o en combinación con otras citoquinas, tales como IL-7, puede usarse para controlar y amplificar la renovación y expansión de células madre pluripotentes para trasplante de sangre de cordón umbilical o médula ósea.

Se ha usado IL-7 recombinante para reconstituir el sistema inmune de un paciente después de trasplante autólogo de médula ósea (Abdul-Hai y col., 1996, Experimental Hematology 24:1416-1422). IL-7 induce la proliferación y diferenciación de células pre B y timocitos inmaduros. TSLP induce efectos proliferativos similares sobre células pre B. Por lo tanto, TSLP, sola o en combinación con otras citoquinas o factores de crecimiento tales como IL-7, puede usarse para estimular la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas.

TSLP induce la fosforilación de tirosina de las dos isoformas de STAT5 (STAT5a y STAT5b), provocando la formación del complejo STAT5-ADN y la transcripción del gen sensible a STAT5 CIS, un modulador de retroalimentación de STAT5 (Levin y col., *supra*; Isaksen y col., *supra*). STAT5 se ha estudiado extensivamente en ratones deficientes en STAT5. Una o ambas formas de STAT5 desempeña una tarea en la modulación del sistema inmune, hematopoyesis, crecimiento sexualmente dimórfico, desarrollo mamario, crecimiento capilar, deposición de tejido adiposo, y embarazo (Davey, y col., 1999, Am. J. Hum. Genet. 65: 959-965). Muchos casos de células de leucemia linfocítica humana recién aisladas han demostrado mostrar activación constitutiva de STAT5 (Nosaka, y col. 1999, The EMBO Journal 18(17):4754-4765).

Como un ejemplo de una actividad regulada por STAT5, STAT5a y STAT5b son necesarias para el crecimiento y diferenciación normal de la glándula mamaria (Richer y col., 1998, J. Biol. Chem. 273(47):31317-31326). Ratones deficientes en STAT5a carecen de brote lóbulo-alveolar mamario proliferativo, y las hembras son incapaces de dar de lactar. Ratones hembra deficientes en STAT5b tienen un desarrollo alterado de la glándula mamaria.

TSLP parece ser un protagonista central en el desarrollo de linfocitos B y T. Las proteínas TSLP son útiles en terapias y tratamientos dirigidos a la estimulación de la proliferación y maduración de linfocitos B y/o T, por ejemplo en el tratamiento de trastornos inmunes, tales como SIDA. La inhibición de la expresión de TSLP, por ejemplo por un anticuerpo anti-TSLP, o el acoplamiento del receptor de TSLP con un fragmento no activo de TSLP o análogo inhibidor de TSLP, puede inhibir el desarrollo y proliferación de linfocitos B y T, y ser terapéuticamente útil, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades autoinmunes o en la prevención del rechazo de trasplantes de órganos.

Se describen polipéptidos TSLP humanos en el documento WO 00/29581. La secuencia de aminoácidos de una realización preferida de la TSLP humana de longitud completa se da en la SEC ID N° 4. El análisis informático predice que la secuencia polipeptídica madura corresponde a los aminoácidos 29 a 159 de la SEC ID N° 4, mientras que el péptido señal se cree que corresponde a los aminoácidos 1 a 28 de la SEC ID N° 4, o como alternativa a los aminoácidos 1 a 34 o a 116. Los polipéptidos huTSLP pueden estar unidos a membranas o ser polipéptidos secretados solubles. En una realización, el polipéptido soluble puede incluir todo o parte del dominio extracelular, pero carecer de la región transmembrana, que causaría la retención del polipéptido en una membrana celular. Los polipéptidos TSLP humanos incluyen variantes del polipéptido codificado por la SEC ID N° 4 que tiene al menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 4 y que retiene al menos una función TSLP, así como fragmentos de la misma que retienen una función TSLP.

### Resistencia a proteasa

Las secuencias de ácido nucleico que codifican TSLP murina (número de acceso a GenBank AF232937) y TSLP humana (número de acceso a GenBank AY037115) se desvelan en la solicitud PCT WO 00/29581. Como se describe más completamente en los siguientes ejemplos, la expresión del ADNc de TSLP humana en células de mamífero a menudo produce un producto degradado.

En contraste con TSLP humana, la TSLP murina no se degradaba cuando se expresaba en células de mamífero. Las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de TSLP humana y murina se compararon, y se hallaron diferencias significativas. En particular, la secuencia de ácido nucleico humana codifica un tramo único de aminoácidos, 127-RRKRK-132, no presente en la proteína murina. Análisis adicionales sugirieron que este tramo único de aminoácidos contenía un sitio putativo de escisión por furina, 127-RRKRK-131.

Como se describe más completamente en los siguientes ejemplos, la proteína TSLP humana sobreexpresada y aislada de cultivos celulares de mamífero, cuando se analizaba, por ejemplo, por electroforesis, contiene varios polipéptidos, mostrados como numerosas bandas en un gel. Una banda prominente en la mezcla de proteínas tiene un peso molecular de aproximadamente 6 kD. La secuencia de aminoácidos del fragmento de 6 kD corresponde al extremo C-terminal de TSLP, lo que sugiere un punto de escisión en el sitio de escisión por furina, RRKRK. Estos datos proporcionan evidencias directas de que la degradación de TSLP humana expresada en células de mamífero provocaba la escisión en el sitio de escisión por furina.



El sitio de escisión por furina está localizado aproximadamente 8 restos antes del inicio de una cuarta hélice de un conjunto de cuatro hélices en la secuencia de aminoácidos de huTSLP que se cree que es necesario para la actividad. El truncamiento de huTSLP en este sitio de escisión por furina produce una citoquina de conjunto de tres hélices, y también elimina los últimos restos de cisteína conservados compartidos entre TSLP de ratón y humana que se cree que están implicados en la formación de enlaces disulfuro intramoleculares. Por consiguiente, la escisión de huTSLP en el sitio de escisión por furina se cree que elimina una parte de la molécula que es necesaria para la actividad biológica.

En la presente invención, se ha identificado un sitio de escisión por furina en huTSLP, y se ha modificado para evitar la escisión por furina de huTSLP. De acuerdo con la invención, se altera uno o más de los codones que codifican el sitio de escisión por furina, RRKRK, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio, para evitar el reconocimiento del sitio de escisión por furina. Preferentemente, se altera uno o más codones para alterar el sitio de escisión. Como el sitio mínimo de reconocimiento por furina es RXXR, cualquier modificación que altere el patrón RXXR en huTSLP está dentro del alcance de la presente invención.

### Polipéptidos TSLP humanos modificados

Los polipéptidos TSLP humanos modificados de la presente invención incluyen polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de TSLP humana expuesta en la SEC ID N° 4, modificada para desactivar el sitio de escisión por furina RRKRK [SEC ID N° 6], así como variantes que tienen una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 4, o fragmentos de la misma, que son tanto resistentes a escisión por furina como también retienen una actividad funcional de TSLP humana.

Para los propósitos de la presente invención, la expresión "sustancialmente similar" se refiere a al menos aproximadamente un 80% idéntica a, preferentemente al menos aproximadamente un 90% idéntica a, más preferentemente al menos aproximadamente un 95% idéntica a, más preferentemente al menos aproximadamente un 98% idéntica a, mucho más preferentemente al menos aproximadamente un 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína inalterada, y que retiene al menos algún grado de al menos una actividad del polipéptido inalterado. Las sustituciones de aminoácidos que son sustituciones conservativas que probablemente no afectan a la actividad biológica se consideran idénticas para los propósitos de la presente invención e incluyen las siguientes: Ala para Ser, Val para Ile, Asp para Glu, Thr para Ser, Ala para Gly, Ala para Thr, Ser para Asn, Ala para Val, Ser para Gly, Tyr para Phe, Ala para Pro, Lys para Arg, Asp para Asn, Leu para Ile, Leu para Val, Ala para Glu, Asp para Gly, y las inversas (véase, por ejemplo, Neurath y col., *The Proteins*, Academic Press, Nueva York (1979)). Puede hallarse información adicional respecto a intercambios de aminoácidos fenotípicamente silenciosos en Bowie y col., 1999, *Science* 247: 1306-1310).

Las modificaciones adecuadas para inactivar el sitio de escisión por furina incluyen sustituciones, deleciones, adiciones o combinaciones de éstas, de aminoácidos, que alteran la secuencia de aminoácidos RRKRK para interrumpir el patrón del sitio de escisión por furina RXXR, particularmente alterando el patrón RX(R/K)R, (en el que R se refiere a arginina, K se refiere a lisina, y X se refiere a cualquier aminoácido). En una realización, la secuencia RKRK o RKRKV se ha delecionado en los polipéptidos TSLP modificados de la presente invención.

Preferentemente, se alteran al menos dos aminoácidos dentro del sitio de escisión por furina para retirar los aminoácidos dibásicos arginina o lisina que pueden reconocerse por furina. Por ejemplo, la modificación puede provocar la sustitución de uno o más aminoácidos bibásicos con uno o más aminoácidos neutros. Los aminoácidos bibásicos también pueden deleccionarse, o puede hacerse una inserción dentro de la región de los aminoácidos 127-131 de la SEC ID N° 4 para alterar el sitio de escisión.

En una realización, los polipéptidos TSLP modificados de la invención incluyen deleciones de uno o más, preferentemente dos o más de los restos de aminoácido 127-RRKRK-131 de la SEC ID N° 4 para alterar el patrón de escisión por furina RXXR. Por ejemplo, la deleción de una arginina (R) provoca la secuencia alterada RKRK o RRKK; la deleción de dos argininas provoca la secuencia alterada KRK o RKK; la deleción de tres argininas provoca la secuencia alterada KK. Los polipéptidos TSLP modificados también incluyen deleciones de cuatro o los cinco aminoácidos básicos, por ejemplo, deleccionando RKRK, RRKR, o RRKRK en las posiciones de los aminoácidos 128-RKRK-131 o 128-RKRKV-132 de la SEC ID N° 4.

En una realización alternativa, los polipéptidos TSLP humanos modificados de la invención incluyen sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de TSLP humana, en la que uno o más, y preferentemente dos o más de los restos de aminoácido 127-RRKRK-131 están sustituidos con un resto diferente de aminoácido, alterando el patrón RXXR. Preferentemente, se sustituye una o más argininas y/o lisinas con un aminoácido no básico, más preferentemente neutro. A modo de ejemplo, la sustitución de una arginina (R) provoca la secuencia alterada RXKRK o RRKXK; la sustitución de dos argininas provoca la secuencia alterada XXKRK o XRKXK; la sustitución de tres argininas provoca la secuencia alterada XXXKX. Se prefiere la sustitución de los cinco aminoácidos básicos que provoca la secuencia XXXXX, en la que X es un aminoácido no básico, preferentemente un aminoácido neutro.

Los polipéptidos huTSLP modificados de la invención también incluyen adiciones de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos huTSLP donde se inserta uno o más restos de aminoácido en la secuencia de escisión por furina 127-

RRKRK-131, alterando el patrón RXXR. Por ejemplo, pueden insertarse dos o más aminoácidos, tal como en la secuencia 127-RRZ<sub>n</sub>KRK-131 donde Z no es R o K, y n no es 1; uno o más, y preferentemente dos o más aminoácidos pueden insertarse entre argininas, o la secuencia 127-RZ<sub>n</sub>RRKRK-131, donde Z no es R o K, y n no es 2; y similares. Preferentemente, n es 3, 4 ó 5, y Z es un aminoácido neutro.

5 Polipéptidos TSLP humanos modificados ejemplares

SITIO DE FURINA

		RXXR
	Nativo [SEC ID N° 4]	.....ATQAMKKRRKRKVVTTN.....
	Modificado* [SEC ID N° 10]	.....ATQAMKKXXXXXVVTTN.....
	Delección 1 [SEC ID N° 12]	.....ATQAMKKR.....VVTTN.....
10	Delección 2 [SEC ID N° 14]	.....ATQAMKK.....VVTTN.....
	Delección 3 [SEC ID N° 16]	.....ATQAMKKR.....TTN.....
	Sustitución* [SEC ID N° 17]	.....ATQAMKKXXRKRVVTTN.....
	Adición** [SEC ID N° 18]	.....ATQAMKKRRKZ.RKVVTTN.....

15 X (\*) Puede indicar una sustitución, delección, inserción o combinación de éstas, de aminoácidos que altera la actividad del sitio de escisión por furina. En una realización ejemplar, por ejemplo, expuesta en la SEC ID N° 10, todos los aminoácidos indicados por X están modificados para ser cualquier aminoácido, preferentemente un aminoácido neutro, diferente de R o L. En otra realización, uno o más, y preferentemente dos o más de X son una delección de aminoácido, mucho más preferentemente dos más restos de arginina (R) están deleccionados, y mucho más preferentemente cada X representa un aminoácido deleccionado. En otra realización, uno o más, y preferentemente dos o más de X son una sustitución de aminoácido que no es K o R, y es preferentemente un aminoácido neutro. En esta realización, XXXXX puede ser, por ejemplo, XRXRX, XRXRK, RXRXX, o RXRXK.

20 Como se expone en la SEC ID N° 18, Z(\*\*) puede ser cualquier aminoácido que no sea R o K, y preferentemente es un aminoácido neutro. Como se ha analizado anteriormente, n puede ser cualquier número que altere el patrón RXXR, por ejemplo, n puede ser 1 o mayor, y preferentemente es 3, 4 ó 5. Otros procedimientos ejemplares para desactivar el patrón del sitio de escisión por furina RXXR y particularmente RXR/KR serán evidentes y están incluidos en la invención.

30 Ejemplos de polipéptidos huTSLP modificados presentados anteriormente incluyen polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEC ID N° 10, 12, 14, 16, 17, ó 18, así como polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente similar a estas secuencias, es decir, que tienen al menos un 80% de identidad con estas secuencias de aminoácidos, y que retienen resistencia a escisión por furina y que también tienen al menos una actividad TSLP. La actividad del polipéptido TSLP humano puede determinarse fácilmente, por ejemplo, sometiéndolo a una variante, derivado, o fragmento de un polipéptido TSLP humano al bioensayo BAF/HRT descrito en el siguiente Ejemplo 3, o usando los ensayos de proliferación de células NAG8/7 descritos por Friend y col., *supra*, o a los ensayos de activación de STAT5 descritos por Levin y col., *supra*.

35 Los polipéptidos huTSLP modificados pueden estar unidos a membrana o ser polipéptidos secretados solubles. En una realización, el polipéptido modificado soluble puede incluir todo o parte del dominio extracelular, pero carecer de la región transmembrana, que causaría la retención del polipéptido sobre la membrana celular. Los polipéptidos TSLP humanos incluyen variantes del polipéptido codificado por la SEC ID N° 4 que tiene al menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 4 y que retiene al menos una función TSLP, así como fragmentos de los mismos tales como el dominio soluble que retiene una función TSLP.

40 Derivados útiles de los polipéptidos modificados de la invención incluyen, por ejemplo, polipéptidos TSLP humanos modificados unidos a al menos un resto químico adicional, o a al menos un polipéptido heterólogo adicional para formar un conjugado covalente o agregado tal como grupos glucosilo, lípidos, fosfato, grupos acetilo, o proteínas de fusión C-terminales o N-terminales y similares. Los polipéptidos heterólogos preferidos incluyen aquellos que facilitan la purificación, estabilidad, direccionamiento celular o tisular, o secreción de la TSLP humana modificada.

45 Las modificaciones de la secuencia de aminoácidos de polipéptidos TSLP humanos pueden realizarse por cualquiera de varias técnicas conocidas. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones en localizaciones particulares por procedimientos conocidos tales como mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (Walder y col., 1986, Gene, 42:133; Bauer y col., 1985, Gene 37:73; Craik, 1985, BioTechniques, 12-19; Smith y col., 1981, Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press; y patente de Estados Unidos N° 4.518.584 y patente de Estados Unidos N° 4.737.462).

50 Los polipéptidos TSLP humanos modificados de la presente invención se proporcionan preferentemente en una forma aislada, y preferentemente están sustancialmente purificados. Los polipéptidos pueden recuperarse y purificarse de cultivos de células recombinantes por procedimientos conocidos, incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxilapatita, y cromatografía en lectina. En una realización preferida, se emplea cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la purificación.

Puede fusionarse TSLP humana modificada a regiones heterólogas usadas para facilitar la purificación del polipéptido. Muchos de los péptidos disponibles (marcas peptídicas) permiten la unión selectiva de la proteína de fusión a un compañero de unión. Ejemplos no limitantes de marcas peptídicas incluyen 6-His, tiorredoxina, hemaglutinina, GST, y la marca de secuencia señal OmpA. Un compañero de unión que reconoce y se une al péptido puede ser cualquier molécula o compuesto incluyendo iones metálicos (por ejemplo, columnas de afinidad por metales), anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, y cualquier proteína o péptido, que se une al péptido heterólogo para permitir la purificación de la proteína de fusión.

Pueden usarse fragmentos que abarcan un sitio de escisión por furina modificado, incluyendo un fragmento donde el sitio de escisión por furina se ha delecionado, para generar anticuerpos específicos contra polipéptidos huTSLP modificados. Los fragmentos deben ser cortos, entre 5 y 20 aminoácidos, y preferentemente entre 5 y 10 aminoácidos. Usando técnicas de selección conocidas, pueden seleccionarse epítotos específicos y usarse para generar anticuerpos monoclonales o policlonales. Dichos anticuerpos tienen utilidad en el ensayo de la actividad huTSLP resistente a proteasa, específicamente la identificación de la expresión de huTSLP resistente a proteasa, y en la purificación de la huTSLP modificado de cultivo celular.

**Secuencias polinucleotídicas de TSLP modificada**

La invención también proporciona moléculas aisladas de ácido nucleico que comprenden polinucleótidos que codifican los polipéptidos huTSLP modificados de la presente invención. Los polinucleótidos de la invención incluyen aquellos que tienen una modificación de la secuencia de nucleótidos en fase que altera o desactiva de otro modo los codones que codifican el sitio de escisión por furina RRKRK [SEC ID N° 6] posicionado en aproximadamente los restos de aminoácido 127-131 de la SEC ID N° 4, tal como, por ejemplo, la secuencia polinucleotídica AGG AGA AAA AGG AAA [SEC ID N° 5]. Las modificaciones adecuadas incluyen sustituciones, deleciones, adiciones o combinaciones de éstas del ácido nucleico en fase, que alteran la secuencia que codifica RRKRK para alterar el patrón del sitio de escisión por furina RXXR codificado, particularmente RX(R/K)R. Por ejemplo, en una realización, la secuencia: AGA AAA AGG AAA GTC [SEC ID N° 7] que codifica una secuencia de aminoácidos RKRKV [SEC ID N° 8] está delecionada.

**Polinucleótidos TSLP humanos modificados ejemplares**

SITIO DE FURINA	K	K	R	R	K	R	K	V	T	T
Nativo [SEC ID N° 3]	AAG	AAG	AGG	AGA	AAA	AGG	AAA	GTC	ACA	ACC
Modificado* [SEC ID N° 9]	AAG	AAG	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	GTC	ACA	ACC
Delección 1 [SEC ID N° 11]	AAG	AAG	AGG	...	...	...	...	GTC	ACA	ACC
Delección 2 [SEC ID N° 14]	AAG	AAG	...	...	...	...	...	GTC	ACA	ACC
Delección 3 [SEC ID N° 16]	AAG	AAG	...	...	...	...	...	...	ACA	ACC

x (\*) puede indicar cualquier sustitución, delección, inserción o combinación de éstas, de nucleótidos en fase, que altere la actividad del sitio de escisión por furina.

En una realización ejemplar expuesta en la SEC ID N° 9, cada xxx codifica cualquier aminoácido excepto R o L, preferentemente un aminoácido neutro. En otra realización, uno o más, y preferentemente dos o más codones xxx están delecionados, mucho más preferentemente dos o más codones que codifican restos de arginina (R) están delecionados, y mucho más preferentemente cada xxx representa un codón delecionado. En otra realización, uno o más, y preferentemente dos o más de x son sustituciones de nucleótidos que no forman codones que codifican K o R, y preferentemente codifican aminoácidos neutros. En una realización adicional, uno o más codones están insertados para alterar la secuencia de aminoácidos del sitio de escisión por furina, como se ha analizado anteriormente, por ejemplo, RRKZ<sub>n</sub>RK. Serán evidentes otros procedimientos ejemplares para modificar los codones para desactivar el patrón del sitio de escisión por furina RXXR y particularmente RXR/KR y se incluyen en la invención.

Por lo tanto, los polinucleótidos huTSLP modificados de la invención incluyen polinucleótidos que tienen deleciones, sustituciones o adiciones en fase en la SEC ID N° 3, siempre que la adición, delección o sustitución desactive el sitio de escisión y codifique una molécula polipeptídica huTSLP resistente a furina que retenga una actividad TSLP. Además, los polinucleótidos de la invención abarcan polinucleótidos que tienen secuencias que son sustancialmente similares a esta SEC ID N° 3 modificada, o un fragmento de la SEC ID N° 3, y que codifica polipéptidos modificados TSLP que retienen tanto al menos una actividad TSLP como resistencia a furina. Como se usa en el presente documento, una molécula de ácido nucleico es "sustancialmente similar a" otra molécula de ácido nucleico si su secuencia polinucleotídica es al menos un 80% idéntica, preferentemente un 90% idéntica, más preferentemente un 95% idéntica, más preferentemente un 98% idéntica, y mucho más preferentemente un 99% idéntica a la secuencia de la segunda molécula de ácido nucleico, y si codifica un polipéptido TSLP modificado de la presente invención que retiene tanto una actividad TSLP como resistencia a furina. La identidad de secuencia polinucleotídica se determina por procedimientos conocidos, por ejemplo por alineación de dos secuencias en un programa de software tal como el programa MACAW creado por Greg Schuler. Además, el porcentaje de identidad puede determinarse por inspección visual y cálculo matemático, o por comparación de la información de secuencia usando el programa

informático GAP, versión 6 descrito por Devereux y col., 1984, Nucl. Acids Res. 12:387, y disponible en la University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG).

5 Los polinucleótidos huTSLP modificados de la presente invención pueden ser ADNc, ADN sintetizado químicamente, ADN amplificado por PCR, ARN, o combinaciones de los mismos. Debido a la degeneración del código genético, dos secuencias de ADN pueden diferir y aún codificar secuencias de aminoácidos idénticas. La presente invención por tanto proporciona una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido huTSLP modificado. Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que tienen una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que es sustancialmente similar a la SEC ID N° 4 que se ha modificado para inactivar el sitio de escisión por furina RRKRK. Como se usa en el presente documento, "sustancialmente similar" se refiere a un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 4 modificada, en la que el polipéptido retiene tanto resistencia a escisión por furina como una actividad TSLP.

15 La presente invención también incluye polinucleótidos que tienen la SEC ID N° 9, 11, 13, ó 15 y polinucleótidos que son sustancialmente similar a estas secuencias polinucleotídicas. Además, la presente invención proporciona polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la SEC ID N° 10, 12, 14, 16, 17, ó 18, y polinucleótidos que codifican polipéptidos que son sustancialmente similares a estos polipéptidos.

20 Los fragmentos útiles de los polinucleótidos de la invención incluyen sondas y cebadores. Éstos pueden usarse, por ejemplo, en procedimientos de PCR para amplificar y detectar la presencia de polinucleótidos huTSLP modificados *in vitro*, así como en transferencias de Southern y Northern para el análisis de huTSLP resistente a proteasa. También pueden identificarse células que sobreexpresan de forma transitoria o estable las moléculas polinucleotídicas huTSLP resistentes a proteasa de la invención mediante el uso de dichas sondas. Los procedimientos para la producción y uso de dichos cebadores y sondas son conocidos.

25 Otros fragmentos útiles incluyen oligonucleótidos antisentido o con sentido que comprenden una secuencia de ácido nucleico monocatenaria capaz de unirse a una secuencia diana de ARNm (usando una hebra con sentido) o ADN (usando una hebra antisentido) de huTSLP modificada.

### **Vectores y células huésped**

30 La presente invención proporciona vectores que contienen los polinucleótidos descritos anteriormente, así como células huésped transformadas con dichos vectores. Cualquiera de las moléculas polinucleotídicas de la invención puede estar contenida en un vector, que generalmente incluye un marcador de selección y un origen de replicación, para su propagación en un huésped. Los vectores incluyen adicionalmente secuencias adecuadas reguladoras de la transcripción o la traducción, tales como las obtenidas de un gen de mamífero, microbiano, viral, o de insecto, unidas de forma funcional a la molécula polinucleotídica huTSLP modificada. Ejemplos de dichas secuencias reguladoras incluyen promotores de la transcripción, operadores, o potenciadores, sitios de unión al ribosoma de ARNm, y secuencias apropiadas que controlan la transcripción y la traducción. Las secuencias de nucleótidos están unidas de forma funcional cuando la secuencia reguladora se refiere funcionalmente al ADN que codifica la proteína diana. Por tanto, una secuencia de nucleótidos promotora está unida de forma funcional a una secuencia de ADN de huTSLP modificada si la secuencia de nucleótidos promotora dirige la transcripción de la secuencia modificada de TSLP.

40 La selección de vectores adecuados para la clonación de moléculas polinucleotídicas de huTSLP resistente a proteasa de la presente invención dependerá de la célula huésped en que se transformará el vector y, cuando sea aplicable, la célula huésped a partir de la cual tiene que expresarse el polipéptido diana. Las células huésped adecuadas incluyen células procariotas, de levadura, y eucariotas superiores, cada una de las cuales se analiza a continuación. Obsérvese que la expresión de los polipéptidos huTSLP modificados es preferible en células de mamífero.

45 Los polipéptidos huSLP modificados a expresar en células huésped también puede ser una proteína de fusión, que incluye el polipéptido TSLP y al menos un polipéptido heterólogo. Como se ha analizado anteriormente, los polipéptidos heterólogos pueden fusionarse al polipéptido TSLP para facilitar, por ejemplo, la secreción, estabilidad, purificación, y/o direccionamiento del polipéptido huTSLP modificado. Ejemplos de proteínas de fusión proporcionadas por la presente invención incluyen fusiones de polipéptidos modificados TSLP con, por ejemplo polipéptidos Fc y dominios de cremallera de leucina para promover la oligomerización de los polipéptidos TSLP como se describe en el documento WO 00/29581.

50 En otra realización, puede incorporarse una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal apropiado en un vector de expresión. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido señal (líder de secreción) puede fusionarse en fase a la secuencia modificada de huTSLP de modo que la huTSLP modificada se traduzca en forma de una proteína de fusión que comprende el péptido señal. Un péptido señal que es funcional en la célula huésped pretendida promueve la secreción extracelular del polipéptido. Preferentemente, la secuencia señal se escindiría del polipéptido huTSLP modificado tras la secreción del polipéptido desde la célula. Ejemplos no limitantes de secuencias señal que pueden usarse en la práctica de la invención incluyen el factor I de lavaduras y el líder de la melatina de la abeja melífera en células de insecto Sf9.

Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos diana de la invención incluyen células procariotas, de levadura, y eucariotas superiores; son más preferidas las células de mamífero. Los huéspedes procariotas adecuados que pueden usarse para la expresión de estos polipéptidos incluyen bacterias de los géneros *Escherichia*, *Bacillus*, y *Salmonella*, así como miembros de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*. Para la expresión en células procariotas, por ejemplo *E. coli*, la molécula polinucleotídica que codifica el polipéptido huTSLP modificado preferentemente incluye un resto de metionina N-terminal para facilitar la expresión del polipéptido recombinante. La Met N-terminal puede escindir-se opcionalmente del polipéptido expresado.

Los vectores de expresión para su uso en huéspedes procariotas generalmente comprenden uno o más genes marcadores de selección fenotípica. Dicho gen generalmente codifica, por ejemplo, una proteína que confiere resistencia a antibióticos o que aporta una necesidad auxotrófica. Está fácilmente disponible una amplia diversidad de dichos vectores en fuentes comerciales. Ejemplos incluyen vectores pSPORT, vectores pGEM (Promega), vectores pPROEX (LTI, Bethesda, MD), vectores Bluescript (Stratagene), y vectores pQE (Qiagen).

La huTSLP modificada también puede expresarse en células huésped de levadura de géneros que incluyen *Saccharomyces*, *Pichia*, y *Kluveromyces*. Son huéspedes de levadura preferidos *S. cerevisiae*, y *P. pastoris*. Los vectores de levadura a menudo contienen una secuencia de origen de replicación de un plásmido de levadura 2T, una secuencia de replicación autónoma (ARS), una región promotora, secuencias para la poliadenilación, secuencias para la terminación de la transcripción, y un gen marcador de selección. También pueden usarse vectores replicables tanto en levaduras como en *E. coli* (llamados vectores lanzadera). Además de las características mencionadas anteriormente de los vectores de levaduras, un vector lanzadera también incluirá secuencias para la replicación y la selección en *E. coli*. La secreción directa de los polipéptidos diana expresados en huéspedes de levadura puede realizarse mediante la inclusión de una secuencia de nucleótidos que codifique la secuencia líder del factor I de levadura en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica huTSLP modificada.

También pueden usarse sistemas de cultivo de células huésped de insecto para la expresión de los polipéptidos huTSLP modificados. Los polipéptidos diana de la invención se expresan preferentemente usando un sistema de expresión de baculovirus, como se describe en una revisión de Luckow y Summers, 1988, *Bio/Technology* 6:47.

En la realización preferida, los polipéptidos huTSLP modificados de la invención se expresan en células huésped de mamífero. Ejemplos no limitantes de líneas celulares de mamífero adecuadas incluyen la línea COS-7 de células renales de mono (Gluzman y col., 1981, *Cell* 23:175), células de ovario de hámster chino (CHO) (Puck y col., 1958, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 60: 1275-1281), células CV-1 (ATC CRL-10478), células 293, células COS, y células de carcinoma cervical humano (HELA) (ATCC CCL 2).

La elección de un vector de expresión adecuado para la expresión de los polipéptidos diana de la invención dependerá de la célula huésped de mamífero específica a usar. Ejemplos de vectores de expresión adecuados incluyen pDC 409 (McMahan y col., 1991, *EMBO J.* 10:2821), pDC 317 (Source), pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen), pSVL (Pharmacia Biotech) y los vectores descritos en el documento WO 01/27299.

Los vectores de expresión para su uso en células huésped de mamífero pueden incluir secuencias de control de la transcripción y la traducción derivadas de genomas virales. Las secuencias promotoras y las secuencias potenciadoras habitualmente usadas que pueden usarse para expresar la TSLP humana modificada incluyen, aunque sin limitación, las derivadas de citomegalovirus humano (CMV), Adenovirus 2, Poliomasvirus, y virus de simio 40 (SV40). Los procedimientos para la construcción de vectores de expresión de mamífero se desvelan, por ejemplo, en Okayama y Berg, 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:280; Cosman y col., 1986, *Mol. Immunol.* 23: 935; Cosman y col., 1984, *Nature* 312:768; documento EP-A-0367566; y documento WO 91/18982.

La modificación de una molécula polinucleotídica de huTSLP resistente a proteasa para facilitar la inserción en un vector particular (por ejemplo, por modificación de sitios de restricción), facilitar el uso en un sistema de expresión o huésped particular (por ejemplo, usando codones preferidos de huésped), y similares, son conocidos y se contemplan para su uso en la invención. Los procedimientos de ingeniería genética para la producción de polipéptidos TSLP humanos modificados incluyen la expresión de las moléculas polinucleotídicas en sistemas de expresión sin células, en huéspedes celulares, en tejidos, y en modelos animales, de acuerdo con procedimientos conocidos.

### Composiciones

La invención proporciona composiciones que contienen un polipéptido huTSLP modificado sustancialmente purificado de la invención y un vehículo. Para aplicaciones terapéuticas, la invención proporciona composiciones adaptadas para uso farmacéutico, por ejemplo, que contienen un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas de la invención se administran a células, tejidos, o pacientes, por ejemplo, para inducir la actividad de linfocitos B y T; y para tratamiento terapéutico, por ejemplo, en la estimulación de la proliferación y desarrollo de células inmunes en pacientes inmunosuprimidos, por ejemplo con SIDA. Las composiciones

farmacéuticas que contienen un polipéptido huTSLP modificado también son útiles como adyuvantes de vacuna, por ejemplo, útiles para obtener inmunidad a largo plazo.

La invención también proporciona reactivos, composiciones, y procedimientos que son útiles para el análisis de la actividad de linfocitos B y T; para el análisis de la actividad STAT5; y para el análisis de los efectos inhibidores/estimuladores de moléculas señal implicadas en respuestas del sistema inmune innato.

### Anticuerpos

Los polipéptidos de la presente invención, por completo o en parte, pueden usarse para generar anticuerpos que son útiles en ensayos para detectar la expresión del polipéptido huTSLP modificado y para la purificación de TSLP humana modificada sobreexpresada. Los anticuerpos contra polipéptidos modificados TSLP pueden usarse como antagonista de la actividad TSLP en un sistema. Los procedimientos para la selección de epítopos peptídicos y la producción de anticuerpos son conocidos. Véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.), 1988 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet y col. (eds.), 1980 Plenum Press, Nueva York.

Además de la producción de anticuerpos, todo o una parte del polipéptido TSLP modificado de la invención puede usarse, por ejemplo, como resto de direccionamiento para dirigir la unión a células y tejidos que expresan receptores de TSLP.

### Ensayos

La actividad TSLP humana puede identificarse y medirse usando varios ensayos incluyendo ensayos que implican los efectos de huTSLP sobre la proliferación y desarrollo de linfocitos B y T. Uno de dichos ensayos se describe en el Ejemplo 3. Pueden usarse células BAF que expresan receptores de TSLP humana (BAF/HTR) que requieren TSLP activa para la proliferación para medir la actividad TSLP como se describe en el Ejemplo 3 en el presente documento. Ensayos adicionales para la actividad hTSLP incluyen, por ejemplo, un ensayo que mide la inducción del crecimiento de linfocitos T a partir de médula ósea humana por TSLP que se describe en el documento WO 00/29581. Otra actividad TSLP es la capacidad de activar STAT5 como se describe en la referencia a Levin y col., 1999, *J. Immunol.* 162:677-683, y en el Ejemplo 4 en el presente documento.

Estos ensayos pueden usarse para determinar y cuantificar en una base relativa la actividad TSLP, para diversos polipéptidos modificados TSLP incluyendo variantes y derivados. Además, estos ensayos pueden usarse para identificar agentes que actúan modificando la actividad TSLP, o eliminando la actividad TSLP. Por ejemplo, una actividad inferior en el ensayo de huTSLP modificado activado en presencia del agente de ensayo, en comparación con la ausencia del agente de ensayo, indica que el agente de ensayo ha disminuido la actividad de la huTSLP modificada. Una actividad superior en el ensayo de huTSLP resistente a proteasa activada en presencia del agente de ensayo que en ausencia del agente de ensayo indica que el agente de ensayo ha aumentado la actividad de la huTSLP resistente a proteasa. Pueden usarse estimuladores e inhibidores de huTSLP modificada para aumentar, inhibir, o modificar la actividad mediada por huTSLP, y por lo tanto pueden tener usos terapéuticos. Por ejemplo, los inhibidores de huTSLP modificada pueden ser útiles para reducir la actividad de linfocitos B y T, por ejemplo en enfermedades autoinmunes o en pacientes que experimentan trasplantes de órganos.

### Aplicaciones terapéuticas

Los polipéptidos huTSLP modificados de la invención pueden usarse terapéuticamente del mismo modo conocido para el uso terapéutico del polipéptido huTSLP, como se analiza en las publicaciones referenciadas anteriormente. TSLP humana es eficaz para estimular las actividades de linfocitos B y T. Por ejemplo, huTSLP, y preferentemente cantidades micromolares de huTSLP modificada soluble induce la diferenciación, proliferación y actividad de linfocitos B y T. Dicha administración es terapéuticamente útil en el tratamiento de infecciones bacterianas y víricas, así como en el tratamiento de células tumorales y deficiencias autoinmunes.

Además, los polipéptidos de la presente invención pueden usarse solos o en combinación con IL-7 para reconstituir el sistema inmune de un paciente después de trasplante autólogo de médula ósea (véase, por ejemplo Abdul-Hai y col., 1996, *Experimental Hematology*, 24:1416-1422). TSLP, debido a sus efectos conocidos sobre STAT5, también puede usarse en terapias dirigidas a modificar los efectos de STAT5 sobre un paciente (véase Richer y col., 1998, *J. Biol. Chem.*, 273(47):31317-31326; Davey y col., 1999, *Am. J. Hum. Genet.*, 65:959-965; Nosaka y col., 1999, *EMBO J*, 18(17):4754-4765).

Los polinucleótidos y polipéptidos TSLP humanos modificados, incluyendo vectores que expresan huTSLP modificada, de la invención pueden formularse en forma de composiciones farmacéuticas y administrarse a un huésped, preferentemente huésped mamífero, incluyendo un paciente humano, en una diversidad de formas adaptadas para la vía elegida de administración. Los compuestos se administran preferentemente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y pueden combinarse con o conjugarse con agentes de suministro específicos, incluyendo anticuerpos de direccionamiento y/o citoquinas.

- La TSLP humana modificada puede administrarse por técnicas conocidas, tales como por vía oral, vía parental (incluyendo inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal o técnicas de infusión), por pulverización de inhalación, por vía tópica, por absorción a través de una membrana mucosa, o por vía rectal, en formulaciones unitarias de dosificación que contienen vehículos, adyuvantes o medios convencionales farmacéuticamente aceptables no tóxicos. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en forma de suspensiones o comprimidos adecuados para administración oral, pulverizaciones nasales, cremas, preparaciones inyectables estériles, tales como suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles o supositorios.
- Para administración oral en forma de una suspensión, las composiciones pueden prepararse de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de formulación farmacéutica. Las composiciones pueden contener celulosa microcristalina para conferir volumen, ácido algínico o alginato sódico como agente de suspensión, metilcelulosa como potenciador de la viscosidad, y edulcorantes o agentes aromatizantes. Como comprimidos de liberación inmediata, las composiciones pueden contener celulosa microcristalina, almidón, estearato de magnesio y lactosa u otros excipientes, aglutinantes, diluentes, disgregantes, diluyentes y lubricantes conocidos en la técnica.
- Para administración por inhalación o aerosol, los comprimidos pueden prepararse de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de formulación farmacéutica. Las composiciones pueden prepararse en forma de soluciones en solución salina, usando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos u otros agentes de solubilización o dispersantes conocidos en la técnica.
- Para la administración en forma de soluciones o suspensiones inyectables, las composiciones pueden formularse de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica, usando agentes adecuados de dispersión o humectantes y de suspensión, tales como aceites estériles, incluyendo mono- o diglicéridos, y ácidos grasos, incluyendo ácido oleico.
- Para administración rectal en forma de supositorios, las composiciones pueden prepararse mezclando con un excipiente no irritante adecuado, tal como manteca de cacao, ésteres sintéticos de glicérido o polietilenglicoles, que son sólidos a temperatura ambiente, pero se licuan o disuelven en la cavidad rectal para liberar el fármaco.
- Las vías de administración preferidas incluyen vía oral, parenteral, así como intravenosa, intramuscular o subcutánea. Más preferentemente, los compuestos de la presente invención se administran por vía parenteral, es decir, intravenosa o intraperitoneal, por infusión o inyección. En una realización de la invención, los compuestos pueden administrarse directamente a un tumor por inyección al tumor; o por suministro sistémico por inyección intravenosa.
- Las soluciones o suspensiones de los compuestos pueden prepararse en agua, solución salina isotónica (PBS) y opcionalmente mezclarse con un tensioactivo no tóxico. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietileno líquido, glicoles, ADN, aceites vegetales, triacetina y mezclas de los mismos. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.
- La forma de dosificación farmacéutica adecuada para uso en inyección o infusión puede incluir soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles que comprenden un ingrediente activo que están adaptado para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables o infundibles estériles. En todos los casos, la forma de dosificación final debe ser estéril, fluida y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. El medio o vehículo líquido puede ser un disolvente o medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol tal como glicerol, propilenglicol, o polietilenglicoles líquidos y similares, aceites vegetales, ésteres no tóxicos de glicerilo, y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, por el mantenimiento del tamaño de partícula necesario, en el caso de dispersión, o mediante el uso de tensioactivos no tóxicos. La prevención de la acción de microorganismos puede realizarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones, o cloruro sódico. La absorción prologada de las composiciones inyectables puede producir mediante la inclusión en la composición de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, hidrogeles de monoestearato de aluminio y gelatina.
- Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado con otros diversos ingredientes enumerados anteriormente y, según sea necesario, seguido de esterilización en filtro. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y secado por congelación, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional presente en las soluciones previamente filtradas a esterilidad.
- Habiendo descrito la invención en líneas generales, la misma se comprenderá más fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes.

**Ejemplos****Ejemplo 1: Reconocimiento y modificación del sitio de escisión por furina**

Las secuencias de ácido nucleico que codifican TSLP murina (número de acceso a GenBank AF232937) [SEC ID N° 3] y TSLP humana [SEC ID N° 5] se desvelaron en la solicitud PCT WO 00/29581. La producción de cantidades útiles de ADNc humano de TSLP en células de mamífero está dificultada, sin embargo, ya que la expresión en células de mamífero a menudo produce un producto degradado.

La expresión de TSLP recombinante humana en células de mamífero proporcionó cantidades sustancialmente inferiores de proteína recombinante de longitud completa que las esperadas. Una parte de la proteína expresada estaba en una forma fragmentada escindida, que tiene un producto de degradación principal de 6 kD. En contraste con TSLP humana, la TSLP murina no se degradaba cuando se expresaba en células de mamífero. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de la TSLP humana y murina se compararon después. Como se muestra en la Tabla 1, la comparación de la secuencia de aminoácidos de TSLP humana con una secuencia de aminoácidos de TSLP murina reveló una serie de restos, comenzando en el resto 128, hallada exclusivamente en la TSLP humana (128-RKRKV-132). Tras investigación adicional, se determinó que los restos representaban un sitio putativo de escisión por furina (127-RRKRK-131). De forma importante, la posición del sitio putativo de escisión por furina se correlacionaba con la liberación de un fragmento C-terminal de aproximadamente 6 kD de TSLP humana.

La secuencia de aminoácidos de huTSLP incluye una región hidrófoba N-terminal que funciona como péptido señal seguida de una serie de 4 hélices que forma una estructura de citoquina de conjunto de cuatro hélices. El sitio putativo de escisión por furina está posicionado aproximadamente 8 aminoácidos antes del inicio de la cuarta hélice del conjunto de cuatro hélices. El truncamiento de la proteína en el sitio de escisión puede producir una proteína TSLP humana inactivada.

**Tabla 1: Comparación de polipéptidos TSLP murinos y humanos**

Humano 1	MFPFALLYVLSVSVFRKIFILQ.LVGLVLTVDFTNCDFEKIKAAAYLSTISK	49
Ratón 1	MVLLRSLFILQVLVLRMGLTYNFSNCNFTSITKIYCNIIIFH	40
Humano 50	DLITYMSGTKSTEFNNTVSCSNRPHCLTEIQSLTFNPTAGCASLAKEMFA	99
Ratón 50	DLTGDLKGAK...FEQIEDCESKPAKLLKIEYYTLNPIPGCPSLPDKTFA	87
Humano 100	MKTKAALAIWCPGYSETQIN.ATQAMKKRRKRKVITTNKCLEQVSQLQGLWR	148
Ratón 100	RRTREALNDHCPGYPETERNDGTQEMAQE.....VQNICLNQTSQILRLW	132
Humano 150	RFNRPLLKQQ [SEC ID N° 4]	
Ratón 150	YSFMQSPE [SEC ID N° 2]	

Cuando se expresa la proteína TSLP y se aísla de cultivos celulares de mamífero, y se analiza, por ejemplo, por electroforesis, se producen varios polipéptidos, mostrados en forma de numerosas bandas en un gel. La banda más prominente en la mezcla de proteínas tiene un peso molecular de aproximadamente 6 kD. La secuencia de aminoácidos del fragmento de 6 kD corresponde con el extremo C-terminal de TSLP, lo que sugiere un punto de escisión en el sitio de escisión por furina, RRKRK. Estos datos proporcionan evidencias directas de que la degradación de TSLP humana expresada en células de mamífero resulta de la escisión en el sitio de escisión por furina.

**Ejemplo 2: Mutagénesis del sitio de furina TSLP humana**

Se usó mutagénesis dirigida al sitio para inactivar el sitio de escisión por furina a partir del transcrito TSLP humana poli-His FLAG, usando 313-TSLP-humana His-FLAG (n° 14095) (1 mg/ml) como molde. Se usó una serie de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) para delecionar la secuencia de nucleótidos: AGA AAA AGG AAA GTC [SEC ID N° 7] que codifica el segmento de huTSLP que contienen el sitio putativo de escisión por furina: RKRKV [SEC ID N° 8]. Además, se diseñó una combinación de cebadores para crear un sitio de restricción Sal-1 en el extremo 5' y un sitio Not-1 en el extremo 3'. Los cebadores fueron los siguientes:

1. Directo (Sal-1): 5'-GTCGACGCCACCATGTTCCCT-3' [SEC ID N° 19]
2. Directo: 5'-ATGAAGAAGAGGACAACCAATAAATGTC-3' [SEC ID N° 20]
3. Inverso: 5'-GACATTTATTGGTTGTCCTCTTTCAT-3' [SEC ID N° 21]
4. Inverso (Not-1): 5'-AGCGGCCGCTCATTTGTCGTC-3' [SEC ID N° 22]

La secuencia polinucleotídica de TSLP humana se muestra a continuación:

**50 TSLP HUMANA (GenBank AY037115)**



```

1 gcagccagaa agctctggag catcagggag actccaactt aaggcaacag catgggtgaa
61 taagggcttc ctgtggactg gcaatgagag gcaaacctg gtgcttgagc actggccctc
121 aaggcagggc ttacagatct cttacactcg tggtggaag agtttagtgt gaaactgggg
181 tgggaattggg tgtccacgta tgttcccttt tgccttacta tatgttctgt cagtttcttt
241 caggaaaatc ttcatcttac aacttgtagg gctgggtgta acttacgact tcactaactg
301 tgactttgag aagattaaag cagcctatct cagtactatt tctaaagacc tgattacata
361 tatgagtggg accaaaagta ccgagttcaa caacaccgtc tctttagtga atcgccaca
421 ttgccttact gaaatccaga gcctaaccctt caatcccacc gccggctgcg cgtcgtcgc
481 caaagaaatg ttcgcatga aaactaaggc tgccttagct atctggtgcc caggctattc
541 ggaaactcag ataaatgcta ctcaggcaat gaagaaggagg agaaaaagga aagtcacaac
601 caataaatgt ctggaacaag tgtcacaatt acaaggattg tggcgtcgtc tcaatcgacc
661 tttactgaaa caacagtaaa ccatctttat tatggtcata tttcacagcc caaaataaat
721 catctttatt aagtaaaaaa aaa [SEC ID N°: 3]

```

Se formó un producto de PCR de 409 bases usando los cebadores 1 y 3 en una primera reacción de PCR. El cebador 1 incluye un sitio de restricción Sal-1, mientras que el cebador 3 deleciona la secuencia de escisión por furina de 15 bases. Se formó un segundo producto de PCR de 162 bases usando los cebadores 2 y 4 en una segunda reacción de PCR, incluyendo el cebador 4 un sitio de restricción NOT-1, mientras que el cebador 2 deleciona el sitio de escisión por furina de 15 bases.

Las reacciones de PCR contenían 10 TI de tampón Amplitaq 10x; 1TI de Amplitaq; 2TI de dNTP (10 pM cada uno); 40 pM de cada cebador; 1TI de molde; agua hasta un volumen final de 100TI. La PCR se realizó en una máquina Perkin Elmer-Gene Amp PCR Systems 2400, a: 1 ciclo de 94°C, 2:00 minutos; 30 ciclos de 94°C, 0:30 minutos, 50°C, 0:15 minutos, y 72°C, 1:00 minuto; y un ciclo de 72°C, 2:00 minutos.

Los productos de PCR se purificaron en geles de agarosa de baja fusión al 1%. Se escindieron las bandas de tamaño apropiado del gel y se purificó el ADN usando un kit de purificación de producto de PCR High Pure obtenido de Boehringer Mannheim. Los productos purificados del gel de 409 y 162 bases se combinaron con los cebadores 1 y 4 para producir un producto de PCR de 558 pares de bases que contenía la secuencia de longitud completa de TSLP humana poliHis-FLAG que carece de la región de 15 pares de bases que codifica el sitio de escisión por furina.

La solución de reacción contenía: 10TI de tampón Amplitaq 10X; 1TI de Amplitaq; 2TI (10 pM cada uno) de dNTP; 15,4TI (40 pM) de cebador 1; 16 TI (40 pM) de cebador 4; 1TI (41 ng) de producto de PCR A; 2TI (119 ng) de producto de PCR B; y agua hasta un volumen final de 100 TI. Como antes, la reacción/condiciones de PCR se realizaron en la máquina Perkin Elmer-Gene Amp PCR Systems 2400. Al final de la reacción, se separó el producto de 558 pares de bases en un gel de agarosa de baja fusión al 1% y se purificó.

La secuencia purificada de TSLP humana modificada se ligó en el vector pGEM-T (Promega), usando los reactivos suministrados con el kit del vector: 1TI de vector pGEM-T; 5TI de tampón de ligamiento 2x; 1TI de ligasa; y 1TI de la TSLP humana modificada de 558 pares de bases (12 ng). La solución de reacción se dejó a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla de ligamiento (2TI) se combinó con 40 TI de *E. coli* DH10I-electrocompetente, y se introdujo por electroporación en las bacterias. Las bacterias sometidas a electroporación entonces se transfirieron a 0,9 ml de solución SOC y se agitaron durante una hora a 37°C.

Se distribuyó un volumen de 0,1TI de esta solución en placas resistentes a ampicilina y se incubaron a 37°C durante una noche. Las colonias se picaron e inocularon en 4 ml de caldo LB que contenía ampicilina. Después de incubación durante una noche en una plataforma de agitación a 37°C, se purificó el ADN plasmídico y se digirió con NOT-1/Sal-1 para confirmar el tamaño correcto del inserto. El vector pGem-T con el inserto de 558 pares de bases se secuenció para confirmar que las manipulaciones moleculares habían producido la mutación deseada.

Se digirió el vector pGEM-T con Not-I y Sal-1, y se subclonó el inserto de 558 pares de bases en los vectores de expresión pDC 409 y pDC317. Las reacciones de digestión y ligamiento se realizaron como se sabe bien en la técnica. Después se usaron los vectores de expresión para producir células CV-1 transfectadas de forma transitoria (ATCC CRL-10478) o para crear células CHO de expresión estable. Obsérvese que para la comparación, se usó un vector de expresión de control que codificaba TSLP humana que tenía un sitio intacto de escisión por furina para producir células transfectadas de forma tanto transitoria como estable.

Las proteínas huTSLP y huTSLP modificada se expresaron cada una en células CV-1 como una proteína de fusión HIS, Flag. La proteína expresada se purificó usando IMAC (cromatografía de afinidad por metales inmovilizados,

usando las instrucciones del fabricante (Qiagen)). El análisis de la proteína expresada en SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras demostró la producción de huTSLP modificada.

5 La secuencia construida de TSLP humana modificada, que tiene el sitio de escisión por furina eliminado, se expresó en forma de una proteína TSLP humana de longitud completa en cultivo de mamífero (células CV-1). Cuando se comparó con la TSLP humana no modificada, se produjo poco o ningún producto de degradación con expresión de TSLP con el sitio de furina deleciónado, lo que demuestra que el sitio de furina era, de hecho, el sitio responsable de la fragmentación de TSLP humana recombinante.

### Ejemplo 3: TSLP humana modificada activa

10 La actividad de la huTSLP modificada, producida como se ha descrito en el Ejemplo 2, se verificó usando un bioensayo celular BAF/HRT. El bioensayo BAF/HTR utiliza una línea celular de pro-linfocitos B murinos, que se ha transfectado con el receptor de TSLP humana (línea celular obtenida de Steven F. Ziegler, Virginia Mason Research Center, Seattle, WA.). La secuencia de ADN del TSLPR se depositó en Genbank (número de acceso AF201963) y se describe en Pandey y col., 2000, Nat Immun 1(1), 59-64. Las células BAF/HTR son dependientes de huTSLP para el crecimiento, y proliferan en respuesta a huTSLP activa añadida en las muestras de ensayo.

15 Se realizaron titulaciones de muestras y patrones en un formato de microtitulación de 96 pocillos. Se añadió una cantidad basal de células BAF/HRT a cada pocillo. Las muestras de huTSLP modificada y los patrones se añadieron a los pocillos. Después de un periodo de incubación, se midió la proliferación celular mediante la adición de colorante azul Alamar I (Biosource International Catalog. n° DAL1100, 10 ul/pocillo). Las células BAF/HRT metabólicamente activas captan y reducen el azul Alamar, lo que conduce a un cambio en las propiedades fluorescentes del colorante. La cantidad de unidades fluorescentes producidas en este ensayo por la huTSLP modificada resistente a proteasa fue similar a la de la huTSLP no modificada de referencia, lo que demuestra que la huTSLP modificada era igual de activa que huTSLP no modificada.

### Ejemplo 4: huTSLP modificada activa STAT5

25 La capacidad de huTSLP modificada de la invención de activar STAT5 se analiza de acuerdo con el procedimiento descrito en Levin y col., 1999 *supra*. En resumen, se priva de citoquinas de células NAG8/7 durante 4-5 horas, después se estimulan a  $10^7$  células/ml con 100 ng/ml de TSLP humana modificada. Se usa huTSLP no modificada como control. Tras la incubación, se recolectan las células, se lavan, y se lisan. Los lisados celulares estimulados se analizan por ensayo de inmunotransferencia, y muestran actividad huTSLP modificada en comparación con el control.

### 30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> IMMUNEX CORPORATION  
Lyman, Stewart D.  
Van Ness, Kirk P.  
35 Paxton, Raymond J.

<120> LINFOPOYETINA ESTROMAL TÍMICA HUMANA MODIFICADA

40 <130> 3255-WO

<140> --A asignar--  
<141> 23-07-2002

45 <150> US 60/307.345  
<151> 23-07-2001

<160> 22

50 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1  
<211> 1125  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

55 <220>  
<221> CDS.  
<222> (18)..(440)

ES 2 422 879 T3

<223>

<400> 1

cacgttcagg cgacagc atg gtt ctt ctc agg agc ctc ttc atc ctg caa 50  
Met Val Leu Leu Arg Ser Leu Phe Ile Leu Gln  
1 5 10

gta cta gta cgg atg ggg cta act tac aac ttt tct aac tgc aac ttc 98  
Val Leu Val Arg Met Gly Leu Thr Tyr Asn Phe Ser Asn Cys Asn Phe  
15 20 25

acg tca att acg aaa ata tat tgt aac ata att ttt cat gac ctg act 146  
Thr Ser Ile Thr Lys Ile Tyr Cys Asn Ile Ile Phe His Asp Leu Thr  
30 35 40

gga gat ttg aaa ggg gct aag ttc gag caa atc gag gac tgt gag agc 194  
Gly Asp Leu Lys Gly Ala Lys Phe Glu Gln Ile Glu Asp Cys Glu Ser  
45 50 55

aag cca gct tgt ctc ctg aaa atc gag tat tat act ctc aat cct atc 242  
Lys Pro Ala Cys Leu Leu Lys Ile Glu Tyr Tyr Thr Leu Asn Pro Ile  
60 65 70 75

cct ggc tgc cct tca ctc ccc gac aaa aca ttt gcc cgg aga aca aga 290  
Pro Gly Cys Pro Ser Leu Pro Asp Lys Thr Phe Ala Arg Arg Thr Arg  
80 85 90

gaa gcc ctc aat gac cac tgc cca ggc tac cct gaa act gag aga aat 338  
Glu Ala Leu Asn Asp His Cys Pro Gly Tyr Pro Glu Thr Glu Arg Asn  
95 100 105

gac ggt act cag gaa atg gca caa gaa gtc caa aac atc tgt ctg aat 386  
Asp Gly Thr Gln Glu Met Ala Gln Glu Val Gln Asn Ile Cys Leu Asn  
110 115 120

caa acc tca caa att cta aga ttg tgg tat tcc ttc atg caa tct cca 434  
Gln Thr Ser Gln Ile Leu Arg Leu Trp Tyr Ser Phe Met Gln Ser Pro  
125 130 135

gaa taa aattagcttt cagcttctgc tatgaaaatc tctatcttgg ttttagtgga 490  
Glu  
140

cagaatacta aggggtgtgac acttagagga cactgggtgt ttattcttta attacagaag 550

ggattcttaa cttatttttt ggcatatcgc ttttttcagt ataggtgctt taaatgggaa 610

atgagcaata gaccgttaat ggaaatatct gtactgttaa tgaccagctt ctgagaagtc 670

tttctcact ccctgcaca caccttactc tagggcaaac ctaactgtag taggaagaga 730

attgaaagta gaaaaaaaa ttaaaaccaa tgacagcate taaaccctgt ttaaaaggca 790

aggatttttc tacctgtaat gattcttcta acattcctat gctaagattt taccaaagaa 850

gaaaatgaca gttcgggcag tcaactgcat gatgaggtgg tctgaaagaa gcttgtggaa 910

tctgggagaa actgctgaga tcatattgca aatccagctg tcaaagggtt cagaccagc 970

acagtacaat tctgtgagcag atctcaagag ccttgcacat ctacgagata tatatttaa 1030

gttgtagata atgaatttct aatttatttt gtgagcactt ttggaaatat acatgctact 1090

ttgtaatgaa tacattgctg aataaagtaa ttctc 1125

5

ES 2 422 879 T3

5  
 <210> 2  
 <211> 140  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 2

Met Val Leu Leu Arg Ser Leu Phe Ile Leu Gln Val Leu Val Arg Met  
 1 5 10 15

Gly Leu Thr Tyr Asn Phe Ser Asn Cys Asn Phe Thr Ser Ile Thr Lys  
 20 25 30

Ile Tyr Cys Asn Ile Ile Phe His Asp Leu Thr Gly Asp Leu Lys Gly  
 35 40 45

Ala Lys Phe Glu Gln Ile Glu Asp Cys Glu Ser Lys Pro Ala Cys Leu  
 50 55 60

Leu Lys Ile Glu Tyr Tyr Thr Leu Asn Pro Ile Pro Gly Cys Pro Ser  
 65 70 75 80

Leu Pro Asp Lys Thr Phe Ala Arg Arg Thr Arg Glu Ala Leu Asn Asp  
 85 90 95

His Cys Pro Gly Tyr Pro Glu Thr Glu Arg Asn Asp Gly Thr Gln Glu  
 100 105 110

Met Ala Gln Glu Val Gln Asn Ile Cys Leu Asn Gln Thr Ser Gln Ile  
 115 120 125

10 Leu Arg Leu Trp Tyr Ser Phe Met Gln Ser Pro Glu  
 130 135 140

15  
 <210> 3  
 <211> 743  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

20  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (200)..(679)  
 <223>

<400> 3

ES 2 422 879 T3

```

gcagccagaa agctctggag catcagggag actccaactt aaggcaacag catgggtgaa      60
taagggcttc ctgtggactg gcaatgagag gcaaaacctg gtgcttgagc actggcccct      120
aaggcaggcc ttacagatct cttacactcg tgggtgggaag agtttagtgt gaaactgggg      180
tgggaattggg tgtccacgt atg ttc cct ttt gcc tta cta tat gtt ctg tca      232
                Met Phe Pro Phe Ala Leu Leu Tyr Val Leu Ser
                1           5           10
gtt tct ttc agg aaa atc ttc atc tta caa ctt gta ggg ctg gtg tta      280
Val Ser Phe Arg Lys Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu
                15           20           25
act tac gac ttc act aac tgt gac ttt gag aag att aaa gca gcc tat      328
Thr Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr
                30           35           40
ctc agt act att tct aaa gac ctg att aca tat atg agt ggg acc aaa      376
Leu Ser Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys
                45           50           55
agt acc gag ttc aac aac acc gtc tct tgt agc aat cgg cca cat tgc      424
Ser Thr Glu Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys
                60           65           70           75
ctt act gaa atc cag agc cta acc ttc aat ccc acc gcc ggc tgc gcg      472
Leu Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala
                80           85           90
tcg ctc gcc aaa gaa atg ttc gcc atg aaa act aag gct gcc tta gct      520
Ser Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala
                95           100           105
atc tgg tgc cca ggc tat tcg gaa act cag ata aat gct act cag gca      568
Ile Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala
                110           115           120
atg aag aag agg aga aaa agg aaa gtc aca acc aat aaa tgt ctg gaa      616
Met Lys Lys Arg Arg Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu
                125           130           135
caa gtg tca caa tta caa gga ttg tgg cgt cgc ttc aat cga cct tta      664
Gln Val Ser Gln Leu Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu
                140           145           150           155
ctg aaa caa cag taa accatcttta ttatgggtcat atttcacagc ccaaaataaa      719
Leu Lys Gln Gln

tcatctttat taagtaaaaa aaaa      743

```

<210> 4  
 <211> 159  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 4

5

10

ES 2 422 879 T3

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

Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asp Phe Thr  
 20 25 30

Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Thr Ile Ser  
 35 40 45

Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser Thr Glu Phe Asn  
 50 55 60

Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu Thr Glu Ile Gln  
 65 70 75 80

Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser Leu Ala Lys Glu  
 85 90 95

Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly  
 100 105 110

Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Arg Arg  
 115 120 125

Lys Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu  
 130 135 140

Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln  
 145 150 155

5 <210> 5  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(15)  
 <223>

15 <400> 5

agg aga aaa agg aaa  
 Arg Arg Lys Arg Lys  
 1 5

15

20 <210> 6  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Arg Arg Lys Arg Lys  
1 5

5 <210> 7  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

10 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(15)  
<223>

<400> 7

15       aga aaa agg aaa gtc  
         Arg Lys Arg Lys Val  
         1                   5

15

20 <210> 8  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8

Arg Lys Arg Lys Val  
1 5

25 <210> 9  
<211> 743  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

30 <220>  
<221> CDS  
<222> (200)..(679)  
<223>

35 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (200)..(679)  
40 <223> "nnn" es un codon que codifica cualquier aminoácido que no sea Arg o Lys.

45 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (200)..(679)  
<223> "Xaa" no es Arg ni Lys; "nnn" no codifica Arg ni Lys.

<400> 9

ES 2 422 879 T3

```

gcagccagaa agctctggag catcaggag actccaactt aaggcaacag catgggtgaa      60
taagggcttc ctgtggactg gcaatgagag gcaaaacctg gtgcttgagc actggcccct      120
aaggcaggcc ttacagatct cttacactcg tgggtgggaag agtttagtgt gaaactgggg      180
tgggaattggg tgtccacgt atg ttc cct ttt gcc tta cta tat gtt ctg tca      232
                Met Phe Pro Phe Ala Leu Leu Tyr Val Leu Ser
                1             5             10

gtt tct ttc agg aaa atc ttc atc tta caa ctt gta ggg ctg gtg tta      280
Val Ser Phe Arg Lys Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu
                15             20             25

act tac gac ttc act aac tgt gac ttt gag aag att aaa gca gcc tat      328
Thr Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr
                30             35             40

ctc agt act att tct aaa gac ctg att aca tat atg agt ggg acc aaa      376
Leu Ser Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys
                45             50             55

agt acc gag ttc aac aac acc gtc tct tgt agc aat cgg cca cat tgc      424
Ser Thr Glu Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys
        60             65             70             75

ctt act gaa atc cag agc cta acc ttc aat ccc acc gcc ggc tgc gcg      472
Leu Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala
                80             85             90

tcg ctc gcc aaa gaa atg ttc gcc atg aaa act aag gct gcc tta gct      520
Ser Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala
                95             100             105

atc tgg tgc cca ggc tat tcg gaa act cag ata aat gct act cag gca      568
Ile Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala
                110             115             120

atg aag aag nnn nnn nnn nnn nnn gtc aca acc aat aaa tgt ctg gaa      616
Met Lys Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu
                125             130             135

caa gtg tca caa tta caa gga ttg tgg cgt cgc ttc aat cga cct tta      664
Gln Val Ser Gln Leu Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu
        140             145             150             155

ctg aaa caa cag taa accatcttta ttatgggtcat atttcacagc ccaaaataaa      719
Leu Lys Gln Gln

tcatctttat taagtaaaaa aaaa      743

```

<210> 10  
 <211> 159  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (127)..(127)  
 <223> La "Xaa" en la localización 127 representa cualquier aminoácido excepto Lys o Arg.

10



5 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (128)..(128)  
<223> La "Xaa" en la localización 128 representa cualquier aminoácido excepto Lys o Arg.

10 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (129)..(129)  
<223> La "Xaa" en la localización 129 representa cualquier aminoácido excepto Lys o Arg.

15 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (130)..(130)  
<223> La "Xaa" en la localización 130 representa cualquier aminoácido excepto Lys o Arg.

20 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (131)..(131)  
<223> La "Xaa" en la localización 131 representa cualquier aminoácido excepto Lys o Arg.

25 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (200)..(679)  
<223> "nnn" es un codon que codifica cualquier aminoácido que no sea Arg o Lys.

30 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (200)..(679)  
<223> "Xaa" no es Arg ni Lys; "nnn" no codifica Arg ni Lys.

<400> 10

ES 2 422 879 T3

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

Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asp Phe Thr  
 20 25 30

Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Thr Ile Ser  
 35 40 45

Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser Thr Glu Phe Asn  
 50 55 60

Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu Thr Glu Ile Gln  
 65 70 75 80

Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser Leu Ala Lys Glu  
 85 90 95

Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly  
 100 105 110

Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Xaa Xaa  
 115 120 125

Xaa Xaa Xaa Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu  
 130 135 140

Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln  
 145 150 155

<210> 11  
 <211> 731  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (200)..(667)  
 <223>

10

<400> 11

gcagccagaa agctctggag catcagggag actccaactt aaggcaacag catgggtgaa 60

taagggcttc ctgtggactg gcaatgagag gcaaaacctg gtgcttgagc actggccct 120

aaggcaggcc ttacagatct cttacactcg tgggtgggaag agtttagtgt gaaactgggg 180

15

ES 2 422 879 T3

```

tggaattggg tgtccacgt atg ttc cct ttt gcc tta cta tat gtt ctg tca      232
      Met Phe Pro Phe Ala Leu Leu Tyr Val Leu Ser
      1              5              10

gtt tct ttc agg aaa atc ttc atc tta caa ctt gta ggg ctg gtg tta      280
Val Ser Phe Arg Lys Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu
      15              20              25

act tac gac ttc act aac tgt gac ttt gag aag att aaa gca gcc tat      328
Thr Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr
      30              35              40

ctc agt act att tct aaa gac ctg att aca tat atg agt ggg acc aaa      376
Leu Ser Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys
      45              50              55

agt acc gag ttc aac aac acc gtc tct tgt agc aat cgg cca cat tgc      424
Ser Thr Glu Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys
      60              65              70              75

ctt act gaa atc cag agc cta acc ttc aat ccc acc gcc ggc tgc gcg      472
Leu Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala
      80              85              90

tcg ctc gcc aaa gaa atg ttc gcc atg aaa act aag gct gcc tta gct      520
Ser Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala
      95              100              105

atc tgg tgc cca ggc tat tcg gaa act cag ata aat gct act cag gca      568
Ile Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala
      110              115              120

atg aag aag agg gtc aca acc aat aaa tgt ctg gaa caa gtg tca caa      616
Met Lys Lys Arg Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln
      125              130              135

tta caa gga ttg tgg cgt cgc ttc aat cga cct tta ctg aaa caa cag      664
Leu Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln
      140              145              150              155

taa accatcttta ttatggtcat atttcacagc ccaaaataaa tcatctttat      717

taagtaaaaa aaaa      731

```

<210> 12  
 <211> 155  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 12

```

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

```

```

Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asp Phe Thr
      20              25              30

```

5

10

ES 2 422 879 T3

Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Thr Ile Ser  
 35 40 45

Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser Thr Glu Phe Asn  
 50 55 60

Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu Thr Glu Ile Gln  
 65 70 75 80

Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser Leu Ala Lys Glu  
 85 90 95

Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly  
 100 105 110

Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Arg Val  
 115 120 125

Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu Gln Gly Leu Trp  
 130 135 140

Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln  
 145 150 155

5 <210> 13  
 <211> 728  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (200)..(664)  
 <223>

<400> 13

ES 2 422 879 T3

```

gcagccagaa agctctggag catcagggag actccaactt aaggcaacag catgggtgaa      60
taagggcttc ctgtggactg gcaatgagag gcaaaacctg gtgcttgagc actggcccct      120
aaggcaggcc ttacagatct cttacactcg tgggtggaag agtttagtgt gaaactgggg      180
tgggaattggg tgtccacgt atg ttc cct ttt gcc tta cta tat gtt ctg tca      232
                Met Phe Pro Phe Ala Leu Leu Tyr Val Leu Ser
                1             5             10

gtt tct ttc agg aaa atc ttc atc tta caa ctt gta ggg ctg gtg tta      280
Val Ser Phe Arg Lys Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu
                15             20             25

act tac gac ttc act aac tgt gac ttt gag aag att aaa gca gcc tat      328
Thr Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr
                30             35             40

ctc agt act att tct aaa gac ctg att aca tat atg agt ggg acc aaa      376
Leu Ser Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys
                45             50             55

agt acc gag ttc aac aac acc gtc tct tgt agc aat cgg cca cat tgc      424
Ser Thr Glu Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys
        60             65             70             75

ctt act gaa atc cag agc cta acc ttc aat ccc acc gcc ggc tgc gcg      472
Leu Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala
                80             85             90

tcg ctc gcc aaa gaa atg ttc gcc atg aaa act aag gct gcc tta gct      520
Ser Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala
                95             100             105

atc tgg tgc cca ggc tat tcg gaa act cag ata aat gct act cag gca      568
Ile Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala
                110             115             120

atg aag aag gtc aca acc aat aaa tgt ctg gaa caa gtg tca caa tta      616
Met Lys Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu
                125             130             135

caa gga ttg tgg cgt cgc ttc aat cga cct tta ctg aaa caa cag taa      664
Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln
        140             145             150

accatcttta ttatggatc atttcacagc ccaaaataaa tcactctttat taagtaaaaa      724

aaaa                                                                 728

```

<210> 14  
 <211> 154  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 14

5

ES 2 422 879 T3

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

Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asp Phe Thr  
 20 25 30

Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Thr Ile Ser  
 35 40 45

Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser Thr Glu Phe Asn  
 50 55 60

Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu Thr Glu Ile Gln  
 65 70 75 80

Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser Leu Ala Lys Glu  
 85 90 95

Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly  
 100 105 110

Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Val Thr  
 115 120 125

Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu Gln Gly Leu Trp Arg  
 130 135 140

Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln  
 145 150

5 <210> 15  
 <211> 728  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (200)..(664)  
 <223>

<400> 15

ES 2 422 879 T3

```

gcagccagaa agctctggag catcagggag actccaactt aaggcaacag catgggtgaa      60
taagggcttc ctgtggactg gcaatgagag gcaaaacctg gtgcttgagc actggcccct      120
aaggcaggcc ttacagatct cttacactcg tgggtgggaag agtttagtgt gaaactgggg      180
tgggaattggg tgtccacgt atg ttc cct ttt gcc tta cta tat gtt ctg tca      232
                Met Phe Pro Phe Ala Leu Leu Tyr Val Leu Ser
                1                5                10
ggt tct ttc agg aaa atc ttc atc tta caa ctt gta ggg ctg gtg tta      280
Val Ser Phe Arg Lys Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu
                15                20                25
act tac gac ttc act aac tgt gac ttt gag aag att aaa gca gcc tat      328
Thr Tyr Asp Phe Thr Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr
                30                35                40
ctc agt act att tct aaa gac ctg att aca tat atg agt ggg acc aaa      376
Leu Ser Thr Ile Ser Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys
                45                50                55
agt acc gag ttc aac aac acc gtc tct tgt agc aat cgg cca cat tgc      424
Ser Thr Glu Phe Asn Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys
60                65                70                75
ctt act gaa atc cag agc cta acc ttc aat ccc acc gcc ggc tgc gcg      472
Leu Thr Glu Ile Gln Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala
                80                85                90
tcg ctc gcc aaa gaa atg ttc gcc atg aaa act aag gct gcc tta gct      520
Ser Leu Ala Lys Glu Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala
                95                100                105
atc tgg tgc cca ggc tat tcg gaa act cag ata aat gct act cag gca      568
Ile Trp Cys Pro Gly Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala
                110                115                120
atg aag aag agg aca acc aat aaa tgt ctg gaa caa gtg tca caa tta      616
Met Lys Lys Arg Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu
                125                130                135
caa gga ttg tgg cgt cgc ttc aat cga cct tta ctg aaa caa cag taa      664
Gln Gly Leu Trp Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln
140                145                150
accatcttta ttatgggtcat atttcacagc ccaaaataaa tcatctttat taagtaaaaa      724
aaaa                                                                728

```

<210> 16  
 <211> 154  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 16

5

ES 2 422 879 T3

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

Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asp Phe Thr  
 20 25 30

Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Thr Ile Ser  
 35 40 45

Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser Thr Glu Phe Asn  
 50 55 60

Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu Thr Glu Ile Gln  
 65 70 75 80

Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser Leu Ala Lys Glu  
 85 90 95

Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly  
 100 105 110

Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Arg Thr  
 115 120 125

Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu Gln Gly Leu Trp Arg  
 130 135 140

Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln  
 145 150

- <210> 17
- <211> 159
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (127)..(129)
- <223> "Xaa" es uno o más aminoácidos que no son Arg ni Lys.
- <400> 17



ES 2 422 879 T3

```

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

Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asp Phe Thr
          20          25          30

Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Thr Ile Ser
          35          40          45

Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser Thr Glu Phe Asn
          50          55          60

Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu Thr Glu Ile Gln
65          70          75          80

Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser Leu Ala Lys Glu
          85          90          95

Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly
          100          105          110

Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Xaa Xaa
          115          120          125

Xaa Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln Leu
130          135          140

Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln
145          150          155

```

5 <210> 18  
 <211> 160  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (130)..(130)  
 <223> "Xaa" es uno o más aminoácidos que no son Arg ni Lys.  
 <400> 18

ES 2 422 879 T3

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

Ile Phe Ile Leu Gln Leu Val Gly Leu Val Leu Thr Tyr Asp Phe Thr  
 20 25 30

Asn Cys Asp Phe Glu Lys Ile Lys Ala Ala Tyr Leu Ser Thr Ile Ser  
 35 40 45

Lys Asp Leu Ile Thr Tyr Met Ser Gly Thr Lys Ser Thr Glu Phe Asn  
 50 55 60

Asn Thr Val Ser Cys Ser Asn Arg Pro His Cys Leu Thr Glu Ile Gln  
 65 70 75 80

Ser Leu Thr Phe Asn Pro Thr Ala Gly Cys Ala Ser Leu Ala Lys Glu  
 85 90 95

Met Phe Ala Met Lys Thr Lys Ala Ala Leu Ala Ile Trp Cys Pro Gly  
 100 105 110

Tyr Ser Glu Thr Gln Ile Asn Ala Thr Gln Ala Met Lys Lys Arg Arg  
 115 120 125

Lys Xaa Arg Lys Val Thr Thr Asn Lys Cys Leu Glu Gln Val Ser Gln  
 130 135 140

Leu Gln Gly Leu Trp Arg Arg Phe Asn Arg Pro Leu Leu Lys Gln Gln  
 145 150 155 160

5 <210> 19  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 19  
 gtcgacgccca ccatgttccc t 21

15 <210> 20  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 20  
 atgaagaaga ggacaaccaa taaatgct 28

25 <210> 21  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

30 <400> 21  
 gacatttatt ggtgtcctc ttcttcat 28

5 <210> 22  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 22  
agcggccgct cattgtcgt c 21

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 4, modificada para inactivar el sitio de escisión por furina RRKRK en la posición 127-131 de la SEC ID N° 4, y en la que el polipéptido tiene al menos una actividad TSLP.
2. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, en la que el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 10, 12, 14, 16, 17 ó 18, y en la que el polipéptido tiene un sitio de escisión por furina inactivado y al menos una actividad TSLP.
- 10 3. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, en la que el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 10, 12, 14, 16, 17 ó 18.
4. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 1, en la que el polinucleótido tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 3 o su complemento, en la que el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene un sitio de escisión por furina inactivado y tiene al menos una actividad TSLP.
- 15 5. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende adicionalmente una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína heteróloga en fase con el polinucleótido de la reivindicación 1.
6. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5, en la que la proteína heteróloga es un resto de direccionamiento celular o una marca peptídica.
- 20 7. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 6, en la que el resto de direccionamiento celular es un anticuerpo que se une a un antígeno de superficie celular o un ligando que se une a un receptor de superficie celular.
8. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5, en la que la proteína heteróloga es un polipéptido Fc.
9. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 una de forma funcional a una secuencia reguladora de la transcripción o la traducción.
- 25 10. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9, en la que dicha secuencia reguladora de la transcripción o la traducción comprende un promotor o potenciador transcripcional.
11. Una proteína que comprende un polipéptido de linfopoyetina estromal tímica (TSLP) humana modificada que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 4 modificada para inactivar el sitio de escisión por furina RRKRK en la posición 127-131 de la SEC ID N° 4, y en la que el polipéptido tiene al menos una actividad TSLP.
- 30 12. La proteína de la reivindicación 11, en la que el polipéptido tiene al menos un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEC ID N° 10, 12, 14, 16, 17, ó 18, en la que el polipéptido tiene un sitio de escisión por furina inactivado y al menos una actividad TSLP.
13. La proteína de la reivindicación 11, en la que el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 10, 12, 14, 16, 17, ó 18.
- 35 14. La proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en la que el polipéptido está fusionado a una proteína heteróloga.
15. La proteína de la reivindicación 14, en la que la proteína heteróloga es una marca peptídica o un resto de direccionamiento celular.
16. La proteína de la reivindicación 14, en la que la proteína heteróloga es un polipéptido Fc.
- 40 17. Un vector que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
18. Una célula huésped modificada por ingeniería genética para expresar la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
19. Una composición que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 11-16 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45 20. Un procedimiento que comprende incubar una célula huésped modificada por ingeniería genética para expresar la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, y producir un polipéptido resistente a furina que tiene al menos una actividad TSLP humana funcional.
21. La proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 11-16 para su uso en la estimulación de la proliferación de linfocitos o linfopoyesis.

22. Un procedimiento *in vitro* para inducir la fosforilación de STAT5 que comprende poner en contacto una muestra que contiene STAT5 con la proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 11-16.
23. Un adyuvante de vacuna que comprende la proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 11-16 y un vehículo.
- 5 24. Uso de la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o la proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 11-16 en la fabricación de un medicamento para estimular la proliferación de linfocitos, para promover la linfopoyesis, o para inducir la fosforilación de STAT5.
25. Un ensayo para detectar la presencia de un agente que reduce la actividad TSLP, comprendiendo dicho ensayo:
- 10 a) poner en contacto, en presencia del agente, una célula que expresar receptores de TSLP con una proteína que comprende un polipéptido de linfopoyetina estromal tímica (TSLP) humana modificada, en el que el polipéptido se selecciona entre las secuencias de aminoácidos que consisten en SEC ID N° 10, 12, 14, 16, 17, y 18; y
- b) medir una actividad TSLP en la célula.
26. El ensayo de la reivindicación 25, en el que el polipéptido TSLP humano modificado está fusionado a una proteína heteróloga.
- 15 27. El ensayo de las reivindicaciones 25 ó 26, en el que el agente es un anticuerpo que se une a la TSLP humana modificada.
28. El ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 25-27, en el que la actividad TSLP se mide detectando el crecimiento celular.
29. El ensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 25-27, en el que la actividad TSLP se mide detectando la actividad STAT5 en la célula.
- 20 30. Uso de una proteína que comprende un polipéptido TSLP humano modificado para determinar la presencia *in vitro* de un anticuerpo que se une a TSLP humana modificada que comprende poner en contacto el polipéptido TSLP humano modificado con un anticuerpo, y detectar la unión del anticuerpo a la TSLP humana modificada, en el que el polipéptido TSLP humano modificado está seleccionado entre las secuencias de aminoácidos que consisten en SEC ID N° 10, 12, 14, 16, 17, y 18.
- 25 31. El uso de la reivindicación 30, en el que el polipéptido TSLP humano modificado está fusionado a una proteína heteróloga.
32. El uso de las reivindicaciones 30 ó 31, en el que el anticuerpo es un antagonista de la actividad TSLP.
- 30 33. El uso de la reivindicación 32, en el que la unión del anticuerpo a la TSLP humana modificada se detecta midiendo la actividad TSLP.
34. El uso de la reivindicación 33, en el que la actividad TSLP se mide en una célula que expresa receptores de TSLP.
35. El uso de la reivindicación 34, en el que la actividad TSLP se mide detectando el crecimiento celular.
36. El uso de la reivindicación 34, en el que la actividad TSLP se mide detectando la actividad STAT5 en la célula.

35