

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 444**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/53** (2006.01)

**A61P 7/06** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2009 PCT/US2009/046910**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2009 WO09152247**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2009 E 09763537 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017 EP 2307046**

54 Título: **Actividad trombopoyética de polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa**

30 Prioridad:

**11.06.2008 US 60747 P**

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

**06.07.2017**

73 Titular/es:

**ATYR PHARMA, INC. (100.0%)  
3565 General Atomics Court, Suite 103  
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**BELANI, RAJESH;  
WATKINS, JEFFREY, DEAN;  
ZHANG, WEI y  
VASSEROT, ALAIN, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 622 444 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

Actividad trombopoyética de polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa

### 5 Campo técnico

La presente divulgación se refiere en general a composiciones trombopoyéticas que comprenden polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa, incluyendo truncamientos y/o variantes de los mismos, y métodos de usar tales composiciones en el tratamiento de enfermedades de estados que se benefician de la trombopoyesis aumentada, tal como enfermedades

10 o afecciones asociadas con trombocitopenia.

### Antecedentes

15 Trombocitopenia se refiere en general a un estado en que el número de plaquetas por volumen unidad de sangre periférica en un sujeto es menor de lo normal. Por ejemplo, los recuentos normales de plaquetas varían desde aproximadamente 150.000 mm<sup>3</sup> a aproximadamente 450.000 mm<sup>3</sup>, y la trombocitopenia típicamente se caracteriza por una disminución en el recuento de plaquetas hasta aproximadamente 100.000/mm<sup>3</sup> o menos.

20 Las plaquetas, o trombocitos, son células sanguíneas incoloras que desempeñan un papel importante en la coagulación de la sangre aglutinándose y formando tapones en agujeros de vasos sanguíneos. Trombopoyesis se refiere al proceso por el que las plaquetas se forman a partir de células hematopoyéticas precursoras, tal como megacariocitos. La trombopoyesis está principalmente regulada por trombopoyetina, que a su vez está regulada por una variedad de mecanismos, tal como absorción mediada por receptor y destrucción en respuesta a niveles aumentados de plaquetas, entre otros factores.

25 La trombocitopenia se asocia con muchas causas subyacentes, tal como destrucción aumentada de plaquetas, producción disminuida de plaquetas, consumo de plaquetas, captura de plaquetas, además de trombocitopenia inducida por medicación. Dado el papel central de las plaquetas en la coagulación sanguínea, los síntomas iniciales de la trombocitopenia normalmente implican varias formas de hemorragia y purpura. Puesto que los sujetos están en riesgo aumentado de hemorragia, el diagnóstico y tratamiento tempranos son importantes, especialmente para la prevención de la evolución a síntomas más serios, tal como hemorragia cerebral.

30 El tratamiento para afecciones de recuento reducido de plaquetas con frecuencia está guiado por la etiología y gravedad de la enfermedad. Los tratamientos actualmente disponibles para trombocitopenia y afecciones relacionadas incluyen, por ejemplo, corticoesteroides, IVIG, esplenectomía, y transfusión de plaquetas, métodos que son paliativos y no específicos, o drásticos y caros. Además, esfuerzos previos para utilizar trombopoyetina, el mediador biológico principal de la trombopoyesis, han fracasado en la clínica debido a los graves efectos observados en pacientes que desarrollaron una respuesta inmunitaria al fármaco y, consecuentemente, a su propia trombopoyetina endógena. Miméticos de trombopoyetina y activadores de molécula pequeña del receptor de trombopoyetina están en desarrollo, pero no han sido aprobados por la Agencia de Alimentos y Fármacos (FDA).

35 Las aminoacil-ARNt sintetetasas, que catalizan la aminoacilación de moléculas de ARNt, son esenciales para decodificar la información genética durante el proceso de traducción. En eucariotas superiores, las aminoacil-ARNt sintetetasas se asocian con otros polipéptidos para formar complejos multienzimáticos supramoleculares. Cada una de las ARNt sintetetasas eucariotas consiste en una enzima central, que está muy relacionada con el homólogo procariota de la ARNt sintetasa, y un dominio adicional que está adjunto al extremo amino-terminal o carboxilo-terminal de la enzima central. La tirosil-ARNt sintetasa (YRS) humana, por ejemplo, tiene un dominio carboxilo-terminal que no es parte de las moléculas de YRS procariotas y de eucariotas inferiores.

40 Las aminoacil ARNt sintetetasas, tal como tirosil-ARNt sintetasa, se asocian actualmente con funciones expandidas en células de mamíferos, incluyendo actividades en rutas de transducción de señales, entre otras.

### Breve compendio

55 La presente divulgación procede del descubrimiento inesperado de que composiciones que comprenden polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa (YRS), incluyendo polipéptidos truncados y/o variantes de los mismos, estimulan la trombopoyesis *in vivo* (es decir, formación aumentada de plaquetas). Según esto, se pueden utilizar formas de realización de la presente divulgación en general para tratar y/o reducir el riesgo de desarrollar enfermedades o afecciones asociadas con trombocitopenia, o niveles reducidos de plaquetas.

60 Ciertas formas de realización de la presente divulgación incluyen métodos de aumentar el recuento de plaquetas en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende una concentración trombopoyéticamente eficaz de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa, aumentando de esta manera el recuento de plaquetas en el sujeto. Ciertas formas de realización de la presente divulgación incluyen métodos de tratar, o reducir el riesgo de desarrollar, trombocitopenia en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende una concentración trombopoyéticamente eficaz de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa, tratando de esta

65

manera o reduciendo el riesgo de desarrollar trombocitopenia en el sujeto. Ciertas formas de realización de la presente divulgación contemplan métodos de estimular trombopoyesis en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende una concentración trombopoyéticamente eficaz de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa, estimulando de esta manera la trombopoyesis en el sujeto. Ciertas formas de realización de la presente divulgación incluyen métodos de mantener el recuento de plaquetas en un sujeto (por ejemplo, un sujeto sometido a una terapia asociada con recuento reducido de plaquetas), que comprenden administrar al sujeto una concentración trombopoyéticamente eficaz de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa, manteniendo de esta manera el recuento de plaquetas en el sujeto.

Ciertas formas de realización de la presente divulgación abarcan métodos de estimular la migración, proliferación y/o diferenciación de megacariocitos en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una concentración trombopoyéticamente eficaz de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa, estimulando de esta manera la proliferación y/o diferenciación de megacariocitos en el sujeto. Ciertas formas de realización de la presente divulgación incluyen métodos de estimular la migración o proliferación de neutrófilos en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una concentración trombopoyéticamente eficaz de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa, estimulando de esta manera la proliferación de neutrófilos en el sujeto.

En ciertos aspectos de la presente divulgación, el sujeto tiene, o está en riesgo de tener, una enfermedad o afección asociada con un recuento de plaquetas disminuido o reducido. En ciertos aspectos de la presente divulgación, el sujeto tiene un recuento de plaquetas de aproximadamente  $100.000/\text{mm}^3$  o menor, aproximadamente  $110.000/\text{mm}^3$  o menor, aproximadamente  $120.000/\text{mm}^3$  o menor, aproximadamente  $130.000/\text{mm}^3$  o menor, aproximadamente  $140.000/\text{mm}^3$  o menor, aproximadamente  $150.000/\text{mm}^3$  o menor. En ciertas formas de realización de la presente divulgación, la enfermedad o afección asociada con un recuento de plaquetas disminuido o reducido incluye, pero no está limitado a, hemorragia, hematomas, epistaxis (hemorragias nasales), hiperesplenismo, hipotermia, infección por virus de Epstein-Barr, mononucleosis infecciosa, síndrome de Wiskott-Aldrich, ingestión materna de tiacidas, trombocitopenia amegacariocítica congénita, síndrome de trombocitopenia con aplasia radial, anemia de Fanconi, síndrome de Bernard-Soulier, anomalía de May-Hegglin, síndrome de plaquetas grises, síndrome de Alport, rubeola neonatal, anemia aplásica, síndrome mielodisplásico, leucemia, linfoma, tumor, cáncer de la médula ósea, deficiencia nutricional, exposición a radiación, insuficiencia hepática, septicemia bacteriana, sarampión, fiebre dengue, infección por VIH o SIDA, prematuridad, eritroblastosis fetal, purpura trombocitopénica idiopática (PTI), PTI materna, síndrome hemolítico-urémico, coagulación intravascular diseminada, purpura trombocitopénica trombótica (PTT), purpura postransfusión, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, trombocitopenia aloinmunitaria neonatal, y hemoglobinuria nocturna paroxística, infección por virus de la hepatitis C (VHC), trombocitopenia inducida por medicación, y trombocitosis inducida por quimioterapia (CIT), entre otras conocidas en la técnica. En ciertos aspectos de la presente divulgación, el sujeto es un donante de plaquetas.

En ciertas formas de realización de la presente divulgación, la afección asociada con un recuento de plaquetas disminuido o reducido está inducida por una medicación o fármaco (por ejemplo, trombocitopenia inducida por medicación, trombocitosis inducida por quimioterapia). Los ejemplos de medicaciones o fármacos que reducen el recuento de plaquetas se pueden seleccionar de agentes quimioterapéuticos, agentes antiinflamatorios no esteroideos, sulfonamidas, vancomicina, clopidogrel, inhibidores de glucoproteína IIb/IIIa, interferones, ácido valproico, abciximab, linezolida, famotidina, mebeverina, bloqueantes de histamina, agentes alquilantes, heparina, alcohol, y antibióticos. En ciertas formas de realización de la presente divulgación, los agentes quimioterapéuticos se pueden seleccionar de cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbacin, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, nitrosurea, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión al receptor de estrógeno, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de farnesil-proteína transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, Temazolomida (una forma acuosa de DTIC), o cualquier análogo o derivado variante de los anteriores.

En ciertas formas de realización de los métodos como se divulgan en el presente documento, el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa comprende una tirosil-ARNt sintetasa de mamífero, incluyendo una tirosil-ARNt sintetasa de mamífero truncada en su extremo C. En ciertos de los métodos proporcionados en el presente documento, el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 o 14, en donde aproximadamente 1-50 residuos de aminoácidos están truncados de su extremo C. En ciertos de los métodos divulgados en el presente documento, el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 o 14, en donde aproximadamente 50-100 residuos de aminoácidos están truncados de su extremo C. En ciertas formas de realización de la presente divulgación, el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 o 14, en donde aproximadamente 100-150 residuos de aminoácidos están truncados de su extremo C. En otras formas de realización de la presente divulgación, el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, o 10, en donde aproximadamente 150-200 residuos de aminoácidos están truncados de su extremo C. En otras formas de realización de la presente divulgación, el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, o 10, en donde aproximadamente 200-250 residuos de aminoácidos están truncados de su extremo C. Ejemplos particulares de polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa truncados C-terminalmente incluyen polipéptidos que comprenden o consisten en los aminoácidos 1-343,

aminoácidos 1-344, aminoácidos 1-350, aminoácidos 1-353, o aminoácidos 1-364 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 2 o 3. Ejemplos adicionales de polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa truncados C-terminalmente incluyen los polipéptidos de SEQ ID NO: 3 y 8.

5 En ciertas formas de realización de los métodos divulgados en el presente documento, el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa comprende una tirosil-ARNt sintetasa de mamífero truncada en su extremo N. En ciertos de los métodos divulgados en el presente documento, el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 o 14, en donde aproximadamente 1-50 residuos de aminoácidos están truncados de su extremo N. En ciertos de los métodos proporcionados en el presente documento, el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 o 14, en donde aproximadamente 50-100 residuos de aminoácidos están truncados de su extremo N. En ciertas formas de realización de la presente divulgación, el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 o 14, en donde aproximadamente 100-150 residuos de aminoácidos están truncados de su extremo N. En otras formas de realización de la presente divulgación, el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, o 10, en donde aproximadamente 150-200 residuos de aminoácidos están truncados de su extremo N. En otras formas de realización de la presente divulgación, el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, o 10, en donde aproximadamente 200-250 residuos de aminoácidos están truncados de su extremo N. Ejemplos particulares de polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa truncados N-terminalmente incluyen los polipéptidos de SEQ ID NO: 6, 10, 12 y 14.

En ciertos de los métodos descritos en el presente documento, el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa se selecciona de: (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, en donde la alanina en posición 341 no está sustituida con una tirosina; (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, en donde la alanina en posición 341 no está sustituida con una tirosina; (c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, en donde la alanina en posición 341 no está sustituida con una tirosina; (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, en donde la alanina en posición 341 no está sustituida con una tirosina; y (e) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2.

En ciertas formas de realización de los métodos divulgados en el presente documento, el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa se selecciona de: (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, o 14; (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, o 14; (c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, o 14; (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, o 14; y (e) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, o 14.

Además de los métodos descritos en el presente documento, ciertas formas de realización de la presente divulgación abarcan composiciones adaptadas para la administración que comprenden un excipiente y/o soporte fisiológicamente aceptable y una concentración trombopoyéticamente eficaz de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa, como se describe en el presente documento, en donde la composición es capaz de estimular trombopoyesis (es decir, aumentar o mantener el recuento de plaquetas en un sujeto), estimular la proliferación y/o diferenciación de megacariocitos, y/o estimular la proliferación de neutrófilos en un sujeto. En ciertas composiciones divulgadas en el presente documento, el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa comprende una tirosil-ARNt sintetasa de mamífero truncada en su extremo C, como se ha descrito anteriormente y en otra parte en el presente documento. En ciertas composiciones divulgadas en el presente documento, el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa comprende una tirosil-ARNt sintetasa de mamífero truncada en su extremo N, como se ha descrito anteriormente y en otra parte en el presente documento.

55 En ciertas formas de realización de la presente divulgación, las composiciones trombopoyéticas descritas en el presente documento comprenden un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa seleccionado de: (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, en donde la alanina en posición 341 no está sustituida con una tirosina; (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, en donde la alanina en posición 341 no está sustituida con una tirosina; (c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, en donde la alanina en posición 341 no está sustituida con una tirosina; (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, en donde la alanina en posición 341 no está sustituida con una tirosina; y (e) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2.

En ciertas formas de realización de la presente divulgación, las composiciones trombopoyéticas descritas en el presente documento comprenden un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa seleccionado de: (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, o 14; (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, o 14; (c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, o 14; (d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, o 14; y (e) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, o 14.

En ciertas formas de realización divulgadas en el presente documento, las composiciones de la presente divulgación comprenden además un segundo polipéptido tirosil-ARNt sintetasa, incluyendo en donde los dos polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa forman un dímero. En ciertos aspectos de la presente divulgación, el dímero es un homodímero. En otros aspectos de la presente divulgación, el dímero es un heterodímero, tal como un heterodímero entre un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa de longitud completa y un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa truncado. En ciertas formas de realización divulgadas en el presente documento, las composiciones de la presente divulgación comprenden además un polipéptido heterólogo, en donde el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa y el polipéptido heterólogo forman un heterodímero, tal como un heterodímero bifuncional.

En ciertas formas de realización de la presente divulgación, las composiciones trombopoyéticas divulgadas en el presente documento comprenden un excipiente y/o soporte fisiológicamente aceptable y una concentración trombopoyéticamente eficaz de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa quimérico, en donde el polipéptido quimérico comprende dos o más fragmentos biológicamente activos de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa, en donde los dos o más fragmentos comprenden al menos 10 aminoácidos contiguos de un polipéptido YRS, en donde los dos o más fragmentos están unidos para formar un polipéptido quimérico, y en donde el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa quimérico es capaz de estimular trombopoyesis y/o aumentar el recuento de plaquetas en un sujeto.

En ciertas formas de realización de la presente divulgación, las composiciones trombopoyéticas divulgadas en el presente documento comprenden un excipiente y/o soporte fisiológicamente aceptable y una concentración trombopoyéticamente eficaz de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa quimérico, en donde el polipéptido quimérico comprende (a) uno o más fragmentos biológicamente activos de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa, en donde el uno o más fragmentos comprenden al menos 10 aminoácidos contiguos de un polipéptido YRS; y (b) uno o más polipéptidos heterólogos, en donde el uno o más fragmentos de (a) y el uno o más polipéptidos heterólogos de (b) están unidos para formar un polipéptido quimérico, y en donde el polipéptido quimérico es capaz de estimular trombopoyesis (es decir, aumentar o mantener el recuento de plaquetas en un sujeto), estimular la proliferación y/o diferenciación de megacariocitos, y/o estimular la proliferación de neutrófilos en un sujeto.

Ciertas formas de realización de la presente divulgación se refieren a métodos de estimular la proliferación y/o diferenciación de células progenitoras de megacariocitos tempranas, que comprenden incubar un cultivo de células madre hematopoyéticas con un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa durante un tiempo suficiente para permitir la proliferación de las células progenitoras de megacariocitos tempranas, estimulando de esta manera la proliferación y/o diferenciación de células progenitoras de megacariocitos tempranas. En ciertas formas de realización de la presente divulgación, el método se realiza *ex vivo* o *in vitro*. En ciertas formas de realización de la presente divulgación, el cultivo se obtiene de médula ósea. En ciertas formas de realización de la presente divulgación, el cultivo se obtiene de sangre de cordón umbilical. En ciertas formas de realización de la presente divulgación, tales métodos comprenden además administrar las células a un sujeto en necesidad de ello.

Ciertas formas de realización de la presente divulgación se refieren a métodos de estimular la migración de una célula que expresa CXCR-2, que comprenden poner en contacto la célula con un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa, estimulando de esta manera la migración de la célula que expresa CXCR-2. En ciertas formas de realización de la presente divulgación, el paso de poner en contacto la célula se produce *in vitro* o *ex vivo*. En ciertas formas de realización de la presente divulgación, el paso de poner en contacto comprende administrar a un sujeto en necesidad de ello una composición que comprende una concentración eficaz de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa.

Ciertas formas de realización de la presente divulgación se refieren a métodos de reducir inflamación pulmonar y/o sus síntomas, en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una concentración eficaz de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa, reduciendo de esta manera la inflamación pulmonar y/o sus síntomas, en el sujeto. En ciertas formas de realización de la presente divulgación, el sujeto tiene una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En ciertas formas de realización de la presente divulgación, la administración del polipéptido tirosil-ARNt sintetasa es eficaz para alcanzar la desensibilización de neutrófilos circulantes a un alérgeno.

### Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la tirosil-ARNt sintetasa humana (SEQ ID NO: 1).

La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante Y341A de tirosil-ARNt sintetasa humana de longitud completa (SEQ ID NO: 2).

5 La figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de una tirosil-ARNt sintetasa humana C-terminalmente truncada (aminoácidos 1-364) que tiene actividad trombopoyética (SEQ ID NO: 3).

La figura 4 muestra una secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de longitud completa de tirosil-ARNt sintetasa humana (SEQ ID NO: 4).

10 Las figuras 5(a) y 5(b) muestran los efectos *in vivo* sobre el número de plaquetas después de la administración de una tirosil-ARNt sintetasa humana truncada. Para la figura 5(a), se inyectaron ratones por vía subcutánea dos veces al día durante siete días con 1, 3 y 10 µg/kg de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa C-terminalmente truncado (SEQ ID NO: 3) que tiene una etiqueta C-terminal de ocho aminoácidos, L-E-H-H-H-H-H-H (SEQ ID NO: 5), y se determinó el recuento de plaquetas al final del estudio. Para la figura 5(b), se inyectaron ratones por vía subcutánea dos veces al día durante 7 días con 3 µg/kg del mismo polipéptido C-terminalmente truncado que en la figura 5(a), y el recuento de plaquetas se determinó al final del estudio.

15 La figura 6 muestra los efectos *in vivo* sobre el número de megacariocitos después de la administración de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa humana C-terminalmente truncado (SEQ ID NO: 3) que tiene una etiqueta C-terminal de ocho aminoácidos, L-E-H-H-H-H-H-H (SEQ ID NO: 5). Los animales se inyectaron por vía subcutánea dos veces al día con 3 y 300 µg/kg de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa de SEQ ID NO: 3 que tiene una etiqueta C-terminal de ocho aminoácidos (SEQ ID NO: 5) durante 6 días y se examinaron la histología de la médula ósea y el bazo al final del estudio.

20 La figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de ajuste de la tirosil-ARNt sintetasa humana SP1 (SEQ ID NO: 6), que representa una variante N-terminalmente truncada de la secuencia del polipéptido YRS de tipo salvaje de longitud completa. La variante de ajuste SP1 tiene 8 o 9 aminoácidos N-terminales que no muestran similitud de secuencia con la secuencia de tipo salvaje. "X" representa cualquier aminoácido.

25 La figura 8 muestra la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 7) que codifica el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa humana SP1 de SEQ ID NO: 6.

30 La figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de ajuste de la tirosil-ARNt sintetasa humana SP2 (SEQ ID NO: 8), que representa una variante C-terminalmente truncada de la secuencia del polipéptido YRS de tipo salvaje de longitud completa. La variante SP2 tiene aproximadamente 35 aminoácidos C-terminales que no muestran similitud de secuencia con la secuencia de tipo salvaje. "X" representa cualquier aminoácido.

35 La figura 10 muestra la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 9) que codifica el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa humana SP2 de SEQ ID NO: 8.

40 La figura 11 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de ajuste de la tirosil-ARNt sintetasa humana SP3 (SEQ ID NO: 10), que representa una variante N-terminalmente truncada de la secuencia del polipéptido YRS de tipo salvaje de longitud completa.

45 La figura 12 muestra la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 11) que codifica el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa humana SP3 de SEQ ID NO: 10.

50 La figura 13 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de ajuste de la tirosil-ARNt sintetasa humana SP4 (SEQ ID NO: 12), que representa una variante N-terminalmente truncada de la secuencia del polipéptido YRS de tipo salvaje de longitud completa.

La figura 14 muestra la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 13) que codifica el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa humana SP4 de SEQ ID NO: 12.

55 La figura 15 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante de ajuste de la tirosil-ARNt sintetasa humana SP5 (SEQ ID NO: 14), que representa una variante N-terminalmente truncada de la secuencia del polipéptido YRS de tipo salvaje de longitud completa. La variante SP5 tiene aproximadamente 8 aminoácidos N-terminales que no muestran similitud de secuencia con la secuencia de tipo salvaje. "X" representa cualquier aminoácido.

60 La figura 16 muestra la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 15) que codifica el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa humana SP5 de SEQ ID NO: 14.

La figura 17 ilustra el ajuste de gen alternativo de la tirosil-ARNt sintetasa humana de tipo salvaje (WT), representada por la secuencia de ADNc de variantes de ajuste alternativos SP1 a SP5.

65

La figura 18 proporciona la anotación de NCBI de las secuencias de ADNc para las variantes de ajuste de tirosil ARNt sintetasa humana SP1 a SP5.

5 La figura 19 representa el alineamiento de la secuencia de proteína de los marcos abiertos de lectura predichos y descritos para los polipéptidos YRS SP1 a SP5 comparados con el polipéptido YRS humano de longitud completa.

La figura 20 muestra la actividad trombopoyética de polipéptidos YRS en ratas (véase el ejemplo 4).

10 La figura 21 muestra la migración de megacarioblastos MO7e en respuesta a estimulación por polipéptidos YRS (véase el ejemplo 5).

La figura 22 muestra que los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa fomentan la adhesión celular de células THP-1 a monocapas endoteliales de células HUVEC-2 (véase el ejemplo 6).

15 La figura 23 muestra que los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa aumentan la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1 en monocapas endoteliales de células HUVEC-2 (véase el ejemplo 6).

20 La figura 24 muestra que los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa estimulan la migración de líneas celulares 293 y CHO transfectadas con el receptor CXCR-2 (véase el ejemplo 7). El gráfico izquierdo en la figura 24 muestra los resultados para células 293/CXCR-2, y el gráfico derecho en la figura 24 muestra los resultados para las células CHO/CXCR-2.

25 La figura 25 muestra los efectos estimuladores de polipéptidos YRS sobre la migración de células polimorfonucleares (PMN) (véase el ejemplo 8).

30 La figura 26 muestra los efectos de polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa sobre células progenitoras de megacariocitos en cultivos de células de médula ósea, medido por el número de colonias (véase el ejemplo 10). La figura 26(A) muestra los efectos estimuladores de polipéptidos YRS sobre la formación de colonias de progenitores de linaje restringido primitivos, o progenitores tempranos, y las figuras 26(B) y (C) muestran los efectos inhibidores de polipéptidos YRS sobre los progenitores intermedios relativamente maduros (B) y progenitores tardíos (C), respectivamente.

### Descripción detallada

35 La presente invención es como se define en las reivindicaciones.

40 La presente divulgación se refiere al inesperado descubrimiento de que polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa (YRS), incluyendo truncamientos y variantes de los mismos, son capaces de mimetizar y estimular el proceso de trombopoyesis normal y, por tanto, poseen actividad trombopoyética terapéuticamente beneficiosa. Ciertas formas de realización de la presente divulgación, por tanto, se refieren al uso de polipéptidos YRS para estimular el proceso de trombopoyesis natural, y aumentar de esta manera la producción de plaquetas en sujetos en necesidad de ello, tal como sujetos que padecen una afección asociada con trombocitopenia (es decir, recuento de plaquetas reducido). Las ventajas del uso de polipéptidos YRS sobre otros tratamientos incluyen, por ejemplo, un mecanismo de acción diferente que los tratamientos tradicionales, sinergia con señalización de trombopoyetina, mayor potencia, y los beneficios asociados con usar una molécula desinmunizada (por ejemplo, sin impacto de potencial respuesta inmunitaria adversa contra trombopoyetina). Otras ventajas serán aparentes a un experto en la materia.

50 La práctica de la presente divulgación empleará, a menos que se indique específicamente lo contrario, métodos convencionales de biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro de la capacidad de la técnica, muchas de las cuales se describen posteriormente con el propósito de ilustración. Tales técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª Edición, 1989); Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (B. Perbal, ed., 1984).

### Definiciones

60 A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por los expertos en la materia a la que la presente divulgación pertenece. Aunque se puede usar cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente divulgación, se describen métodos y materiales preferidos. Para los fines de la presente divulgación, los siguientes términos se definen a continuación.

Los artículos “un” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

5 Mediante “aproximadamente” se quiere decir una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía en tanto como el 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1% respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

10 El término “fragmento biológicamente activo”, como se aplica a fragmentos de un secuencia polinucleotídica o polipeptídica de referencia, se refiere a un fragmento que tiene al menos aproximadamente el 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000% o más de la actividad de una secuencia de referencia. Incluidos dentro del ámbito de la presente divulgación están fragmentos biológicamente activos de al menos  
15 aproximadamente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, o más nucleótidos o residuos de aminoácidos contiguos en longitud, incluyendo todos los números enteros entre ellos, que comprenden o codifican una actividad trombopoyética de un polinucleótido o polipéptido de referencia, tal como las secuencias de polipéptidos de referencia de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, y 14, o las secuencias de nucleótidos de referencia de SEQ ID NO: 4, 7, 9, 11, 13, y 15. Los ejemplos particulares de fragmentos biológicamente activos incluyen, pero no está limitado a, polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa C-terminalmente truncados que comprenden o consisten en los aminoácidos 1-343, aminoácidos 1-344, aminoácidos 1-350, aminoácidos 1-353, o aminoácidos 1-364 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, además de los polipéptidos de SEQ ID NO: 3 y 6. Los ejemplos adicionales de fragmentos biológicamente activos incluyen, pero no están limitados, a polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa N-terminalmente truncados que comprenden o consisten en las secuencias de aminoácidos mostradas en  
20 SEQ ID NO: 6, 10, 12 y 14. Los fragmentos biológicamente activos representativos en general participan en una interacción, por ejemplo, una interacción intramolecular o intermolecular. Una interacción intermolecular puede ser una interacción de unión específica o una interacción enzimática. Una interacción intermolecular puede ser entre un polipéptido YRS y una molécula diana, tal como una molécula diana implicada en regular el proceso de trombopoyesis. Los fragmentos biológicamente activos de un polipéptido YRS incluyen fragmentos polipeptídicos que comprenden secuencias de aminoácidos con suficiente similitud o identidad a, o que derivan de, las secuencias de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, o 14, incluyendo partes trombopoyéticamente eficaces de las mismas, o están codificadas por una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4, 7, 9, 11, 13, y 15.

35 Mediante “secuencia codificante” se quiere decir cualquier secuencia de ácido nucleico que contribuye al código para el producto polipeptídico de un gen. En contraste, el término “secuencia no codificante” se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico que no contribuye al código para el producto polipeptídico de un gen.

40 A lo largo de esta especificación, a menos que el contexto requiera otra cosa, las palabras “comprender”, “comprende” y “que comprende” se entenderá que implican la inclusión de un paso o elemento o grupo de pasos o elementos indicados, pero no la exclusión de cualquier otro paso o elemento o grupo de pasos o elementos.

45 Mediante “consistir en” se quiere decir que incluye, y limitado a, lo que sigue a la frase “consistir en”. Por tanto, la frase “que consiste en” indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que ningún otro elemento puede estar presente. Mediante “consistir esencialmente en” se quiere decir que incluye cualquier elemento enumerado después de la frase, y limitado a otros elementos que no interfieren con o contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación para los elementos enumerados. Por tanto, la frase “que consiste esencialmente en” indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes dependiendo de si afectan o no la actividad o acción de los elementos enumerados.  
50

Los términos “complementario” y “complementariedad” se refieren a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia “A-G-T”, es complementaria a la secuencia “T-C-A”. La complementariedad puede ser “parcial”, en la que solo algunas de las  
55 bases de los ácidos nucleicos están apareadas según las reglas de apareamiento de bases. O, puede ser complementariedad “completa” o “total” entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre hebras de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficacia y fuerza de hibridación entre hebras de ácido nucleico.

60 Mediante “corresponde a” o “correspondiente a” se quiere decir (a) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica o complementaria a todo o una parte de una secuencia de polinucleótido de referencia o que codifica una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos en un péptido o proteína; o (b) un péptido o polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos en un péptido o proteína de referencia.

65 Mediante “derivado” se quiere decir un polipéptido que se ha derivado de la secuencia básica por modificación, por ejemplo, por conjugación o formación de complejos con otras fracciones químicas (por ejemplo, pegilación) o por

técnicas de modificación postraduccional como se entendería en la técnica. El término “derivado” también incluye en su ámbito alteraciones que se han hecho a una secuencia parental incluyendo adiciones o deleciones que proporcionan moléculas funcionalmente equivalentes.

5 Como se usan en el presente documento, los términos “función” y “funcional” y similares se refieren a una función biológica, enzimática o terapéutica.

Mediante “gen” se quiere decir una unidad de herencia que ocupa un locus específico en un cromosoma y consiste en secuencias reguladoras transcripcionales y/o traduccionales y/o una región codificante y/o secuencias no traducidas (por ejemplo, intrones, secuencias no traducidas en 5' y 3').

“Homología” se refiere al número en porcentaje de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservadoras. La homología se puede determinar usando programas de comparación de secuencias tal como GAP (Deveraux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Research* **12**, 387-395). De esta manera secuencias de una longitud similar o sustancialmente diferentes a las citadas en el presente documento se podrían comparar por inserción de huecos en el alineamiento, tales huecos están determinados, por ejemplo, por el algoritmo de comparación usado por GAP.

El término “célula huésped” incluye una célula individual o cultivo de células que puede ser o ha sido receptor de cualquier vector recombinante o polinucleótido aislado de la presente divulgación. Las células huésped incluyen la progenie de una única célula huésped, y la progenie puede no ser necesariamente idéntica por completo (en morfología o en complemento de ADN total) a la célula parental original debido a mutación y/o cambio natural, accidental o deliberado. Una célula huésped incluye células transfectadas o infectadas *in vivo* o *in vitro* con un vector recombinante o un polinucleótido de la presente divulgación. Una célula huésped que comprende un vector recombinante de la presente divulgación es una célula huésped recombinante.

Mediante “aislado” se quiere decir material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. Por ejemplo, un “polinucleótido aislado”, como se usa en el presente documento, se refiere a un polinucleótido, que se ha purificado de las secuencias que lo flanquean en un estado natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que se ha retirado de las secuencias que están normalmente adyacentes al fragmento. Alternativamente, un “péptido aislado” o un “polipéptido aislado” y similares, como se usa en el presente documento, se refiere a aislamiento y/o purificación *in vitro* de una molécula de péptido o polipéptido de su medio celular natural, y de la asociación con otros componentes de la célula, es decir, no está asociado con sustancias *in vivo*.

Mediante “obtenido de” se quiere decir que una muestra tal como, por ejemplo, un extracto de polinucleótido o extracto de polipéptido se aísla de, o deriva de, una fuente particular del sujeto. Por ejemplo, el extracto se puede obtener de un tejido o un fluido biológico aislado directamente del sujeto.

El término “oligonucleótido” como se usa en el presente documento se refiere a un polímero compuesto de una multiplicidad de residuos de nucleótidos (desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o variantes estructurales relacionadas o análogos sintéticos de los mismos) unidos a través de enlaces fosfodiéster (o variantes estructurales relacionadas o análogos sintéticos del mismo). Por tanto, mientras el término “oligonucleótido” típicamente se refiere a un polímero de nucleótidos en el que los residuos de nucleótidos y enlaces entre ellos son naturales, se entenderá que el término también incluye en su ámbito varios análogos incluyendo, pero no restringido a, ácidos péptido nucleicos (APN), fosforamidatos, fosforotioatos, metilfosfonatos, ácidos 2-O-metilribonucleicos, y similares. El tamaño exacto de la molécula puede variar dependiendo de la aplicación particular. Un oligonucleótido es típicamente bastante corto de longitud, generalmente desde aproximadamente 10 a 30 residuos de nucleótidos, pero el término se puede referir a moléculas de cualquier longitud, aunque el término “polinucleótido” o “ácido nucleico” típicamente se usa para oligonucleótidos grandes.

El término “operativamente unido” como se usa en el presente documento significa colocar un gen estructural bajo el control regulador de un promotor, que entonces controla la transcripción y opcionalmente la traducción del gen. En la construcción de combinaciones promotor heterólogo/gen estructural, generalmente se prefiere colocar la secuencia genética o promotor a una distancia del sitio de inicio de la transcripción del gen que sea aproximadamente igual a la distancia entre esa secuencia genética o promotor y el gen que controla en su marco natural; es decir, el gen del que deriva la secuencia genética o promotor. Como se sabe en la técnica, se puede acomodar alguna variación en esta distancia sin pérdida de función. De forma similar, el posicionamiento preferido de un elemento de secuencia regulador con respecto a un gen heterólogo que se va a colocar bajo su control se define por el posicionamiento del elemento en su marco natural; es decir, los genes de los que deriva.

La relación “polinucleótido” o “ácido nucleico” como se usa en el presente documento designa ARNm, ARN, ARNc, ADNc o ADN. El término típicamente se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótidos. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN.

Los términos “variante de polinucleótido” y “variante” y similares se refieren a polinucleótidos que muestran sustancial identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótido de referencia o polinucleótidos que hibridan con una secuencia de referencia en condiciones rigurosas que se definen posteriormente en el presente documento. Estos términos también abarcan polinucleótidos que se distinguen de un polinucleótido de referencia por la adición, 5 delección o sustitución de al menos un nucleótido. Según esto, los términos “variante de polinucleótido” y “variante” incluyen polinucleótidos en los que uno o más nucleótidos se han añadido o delecionado, o sustituido con nucleótidos diferentes. A este respecto, se entiende bien en la técnica que se pueden hacer ciertas alteraciones inclusivas de mutaciones, adiciones, delecciones y sustituciones a un polinucleótido de referencia por lo cual el polinucleótido alterado retiene la función o actividad biológica del polinucleótido de referencia. Las variantes de 10 polinucleótidos incluyen, por ejemplo, polinucleótidos que tienen al menos el 50% (y de al menos el 51% hasta al menos el 99% y todos los porcentajes en números enteros entre medias) de identidad de secuencia con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4, o partes de la misma que codifican un fragmento biológicamente activo de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa trombopoyético. Los términos “variante de polinucleótido” y “variante” también incluyen variantes alélicas naturales.

“Polipéptido”, “fragmento polipeptídico”, “péptido” y “proteína” se usan de forma intercambiable en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos y a variantes y análogos sintéticos de los mismos. Por tanto, estos términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de 20 aminoácidos son aminoácidos sintéticos no naturales, tal como un análogo químico de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos naturales.

Los términos “tirosina ARN sintetasa y “tirosil-ARNt sintetasa” se usan de forma intercambiable en el presente documento, y se refieren a un polipéptido “YRS” de la presente divulgación.

Como se divulga en el presente documento, las relaciones “polipéptidos YRS”, “fragmentos polipeptídicos YRS”, “polipéptidos YRS truncados” o “variantes de los mismos” abarcan, sin limitación, polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos que comparte al menos el 50% (y de al menos el 51% hasta al menos el 99% y todos los porcentajes en números enteros entre medias) de identidad de secuencia con una secuencia de referencia mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, o 14, incluyendo fragmentos biológicamente activos de los 30 mismos, tal como fragmentos que tienen al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200 o más aminoácidos contiguos de las secuencias de referencia, incluyendo todos los números enteros entre medias. Estas relaciones abarcan además variaciones alélicas naturales de polipéptidos YRS que pueden existir y producirse de un género o especie a otra.

Como se divulga en el presente documento, polipéptidos YRS, incluyendo truncamientos y/o variantes de los mismos, abarcan polipéptidos que muestran al menos aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000% o más de la actividad biológica específica de un polipéptido YRS de referencia (es decir, tal como que tiene una actividad trombopoyética en un sujeto o *in vitro*). Para los fines de la presente divulgación, la actividad biológica 40 relacionada con YRS se puede cuantificar, por ejemplo, midiendo la capacidad de un polipéptido YRS de bien aumentar el recuento de plaquetas en un sujeto, o aumentar el número de megacariocitos en un sujeto (véase, por ejemplo, el ejemplo 1). Además, se describen modelos animales adecuados para medir la producción de plaquetas humanas en Suzuki *et al.*, *European Journal of Haematology* 78:123-130, 2007. Los modelos adecuados *in vitro* para medir actividad trombopoyética se describen en el ejemplo 2, y además incluyen ensayar la formación de colonias de megacariocitos, como se ejemplifica en Dessypris *et al.*, *Exp Hematol.* 18:754-7, 1990. Como se divulga en el presente documento, polipéptidos YRS, incluyendo truncamientos y/o variantes de los mismos, que tienen sustancialmente actividad biológica reducida relativa a un polipéptido YRS de referencia de tipo salvaje son los que muestran menos de aproximadamente el 25%, el 10%, el 5% o el 1% de la actividad específica de YRS de tipo salvaje. 50

La relación “variante” de polipéptido se refiere a polipéptidos que se distinguen de un polipéptido de referencia por la adición, delección o sustitución de al menos un residuo de aminoácido. En ciertas formas de realización de la presente divulgación, una variante de polipéptido se distingue de un polipéptido de referencia por una o más sustituciones, que pueden ser conservadoras o no conservadoras. En ciertas formas de realización de la presente divulgación, la variante de polipéptido comprende sustituciones conservadoras y, a este respecto, se entiende bien 55 en la técnica que algunos aminoácidos se pueden cambiar por otros con propiedades ampliamente similares sin cambiar la naturaleza de la actividad del polipéptido. Las variantes polipeptídicas también abarcan polipéptidos en los que uno o más aminoácidos se han añadido o delecionado, o sustituido con diferentes residuos de aminoácidos.

La presente divulgación contempla el uso en los métodos descritos en el presente documento de variantes de polipéptidos YRS de longitud completa (por ejemplo, un polipéptido de longitud completa que tiene una sustitución Y341A), fragmentos truncados de polipéptidos YRS de longitud completa, variantes de fragmentos truncados, así como sus fragmentos biológicamente activos relacionados. Típicamente, los fragmentos biológicamente activos de un polipéptido YRS pueden participar en una interacción, por ejemplo, una interacción intramolecular o intermolecular. Una interacción intermolecular puede ser una interacción de unión específica o una interacción 65 enzimática (por ejemplo, la interacción puede ser transitoria y un enlace covalente se forma o rompe). Los

fragmentos biológicamente activos de un polipéptido YRS incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente similares a, o derivadas de, las secuencias de aminoácidos de una (putativa) secuencia de polipéptido YRS de longitud completa, tal como SEQ ID NO: 1, o partes de la misma, tal como los polipéptidos de SEQ ID NO: 3, 6, 8, 10, 12, y 14. Típicamente, los fragmentos biológicamente activos comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de un polipéptido YRS y pueden incluir uno o más (y en algunos casos todos) de los varios dominios activos, e incluyen fragmentos que tienen una actividad trombopoyética. En algunos casos, los fragmentos biológicamente activos de un polipéptido YRS tienen una actividad biológica (por ejemplo, actividad trombopoyética) que es única al fragmento particular, truncado, de modo que el polipéptido YRS de longitud completa puede no tener esa actividad. En ciertos casos, la actividad biológica se puede revelar separando el fragmento de polipéptido YRS biológicamente activo de las otras secuencias del polipéptido YRS de longitud completa, o alterado ciertos residuos (por ejemplo, Y341A) de la secuencia del polipéptido de tipo salvaje YRS de longitud completa para desenmascarar los dominios trombopoyéticamente activos. Como se divulga en el presente documento, un fragmento biológicamente activo de un polipéptido YRS truncado puede ser un fragmento polipeptídico que tiene, por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400 o más aminoácidos contiguos, incluyendo todos los números enteros entre medias, de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, o 14. En ciertas formas de realización de la presente divulgación, un fragmento biológicamente activo comprende una secuencia, dominio o motivo que estimula trombopoyesis. Adecuadamente, el fragmento biológicamente activo tiene no menos de aproximadamente el 1%, 10%, 25%, 50% de una actividad del polipéptido de tipo salvaje del que deriva.

Las relaciones "identidad de secuencia" o, por ejemplo, que comprende una "secuencia el 50% idéntica a", como se usa en el presente documento, se refiere al nivel que las secuencias son idénticas en una base nucleótido a nucleótido o una base aminoácido a aminoácido sobre una ventana de comparación. Por tanto, un "porcentaje de identidad de secuencia" se puede calcular comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se producen la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

Los términos usados para describir relaciones de secuencias entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" tiene al menos 12 pero frecuentemente de 15 a 18 y con frecuencia al menos 25 unidades monoméricas, inclusive de nucleótidos o residuos de aminoácidos, de longitud. Puesto que dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, solo una parte de la secuencia de polinucleótido completa) que sea similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) polinucleótidos típicamente se realizan comparando secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, habitualmente de aproximadamente 50 hasta aproximadamente 100, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en las que una secuencia se compara con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alineen óptimamente. La ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) de aproximadamente el 20% o menos comparado con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. Los alineamientos óptimos de secuencias para alinear una ventana de comparación se pueden realizar por implementaciones computarizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software Wisconsin Genetics publicación 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EE UU) o por inspección y el mejor alineamiento (es decir, que produce el mayor porcentaje de homología en la ventana de comparación) generado por cualquiera de los varios métodos seleccionados. También se puede hacer referencia a la familia de programas BLAST, por ejemplo, divulgados por Altschul *et al.*, 1997, *Nucl. Acids Res.* 25:3389. Se puede encontrar una discusión detallada de análisis de secuencia en la Unidad 19.3 de Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15.

Un "sujeto", como se usa en el presente documento, incluye cualquier animal que muestra un síntoma, o está en riesgo de mostrar un síntoma, que se puede tratar con un polipéptido YRS trombopoyético de la presente divulgación. Los sujetos (pacientes) adecuados incluyen animales de laboratorio (tal como ratón, rata, conejo, o cobaya), animales de granja, y animales domésticos o mascotas (tal como un gato o perro). Los primates no humanos y, preferiblemente, pacientes humanos, están incluidos. Los sujetos típicos incluyen animales que muestran, o están en riesgo de mostrar, cantidades anómalas de una o más actividades fisiológicas que se pueden modular por un polipéptido trombopoyético, tal como recuentos de plaquetas disminuidos o reducidos (es decir, trombocitopenia). Típicamente, un sujeto que tiene trombocitopenia, o un recuento de plaquetas "reducido", como se usa en el presente documento, se refiere a un sujeto que tiene una disminución en el recuento de plaquetas hasta aproximadamente 100.000/mm<sup>3</sup> o menor, aproximadamente 110.000/mm<sup>3</sup> o menor, aproximadamente 120.000/mm<sup>3</sup>

o menor, aproximadamente 130.000/mm<sup>3</sup> o menor, aproximadamente 140.000/mm<sup>3</sup> o menor, aproximadamente 150.000/mm<sup>3</sup> o menor, comparado con un recuento normal de plaquetas. Como se usa en el presente documento, un recuento de plaquetas "normal" generalmente varía desde aproximadamente 150.000/mm<sup>3</sup> hasta aproximadamente 450.000/mm<sup>3</sup> en un sujeto. Como ejemplo, un "sujeto" también puede estar a punto de someterse, o se está sometiendo, o se ha sometido, a un procedimiento de trasplante, tal como un trasplante de células madre o médula ósea. Un sujeto también puede tener un trastorno o enfermedad pulmonar, tal como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), y/o padecer una inflamación pulmonar.

"Trombopoyesis", como se usa en el presente documento se refiere a la formación de plaquetas sanguíneas, o trombocitos.

Una "concentración trombopoyéticamente eficaz" de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa, como se describe en el presente documento, se refiere a una cantidad que es capaz de "tratar" un sujeto, tal como que es "eficaz" para estimular o aumentar la trombopoyesis, como se mide típicamente por niveles aumentados de plaquetas, niveles mantenidos de plaquetas, números aumentados de megacariocitos, y/o producción aumentada de neutrófilos.

Un "megacariocito" se refiere en general a una célula de la médula ósea que es responsable para la producción de trombocitos sanguíneos (es decir, plaquetas), que con necesarios para la coagulación sanguínea normal. Los megacariocitos típicamente representan 1 de 10.000 células de médula ósea. Los megacariocitos derivan de células precursoras de células madre hematopoyéticas pluripotentes en la médula ósea. La trombopoyetina (TPO) es la señal principal para la producción de megacariocitos, es decir, TPO es suficiente, pero no absolutamente necesaria para inducir la diferenciación de células progenitoras en médula ósea hacia un fenotipo de megacariocito final. Otras señales moleculares para la diferenciación de megacariocitos incluyen GM-CSF, IL-3, IL-6, IL-11, quimioquinas (SDF-1, FGF-4), y eritropoyetina.

Se cree que los megacariocitos se desarrollan a través del siguiente linaje: CFU-Me (célula madre hematopoyética pluripotente o hemocitoblasto) → megacarioblasto → promegacariocito → megacariocito. En la fase de megacarioblasto, la célula pierde su capacidad de dividirse, pero aún es capaz de replicar su ADN y continuar el desarrollo, volviéndose poliploide. Tras la maduración, los megacariocitos empiezan el proceso de producir plaquetas. La trombopoyetina desempeña un papel en inducir que el megacariocito forme pequeñas prolongaciones proto-plaquetas, o membranas internas citoplásmicas para almacenar plaquetas antes de la liberación. Tras la liberación, cada una de estas prolongaciones proto-plaquetas puede dar lugar a 2000-5000 nuevas plaquetas. En total, aproximadamente 2/3 de las plaquetas recién liberadas permanecerán en circulación y aproximadamente 1/3 serán secuestradas por el bazo. Después de liberar las plaquetas, el núcleo celular restante típicamente cruza la barrera de la médula ósea a la sangre y se consume en el pulmón por macrófagos alveolares.

Un "neutrófilo", o granulocito neutrófilo, se refiere en general a un tipo abundante de glóbulos blancos en seres humanos que, junto con basófilos y eosinófilos, forman parte de la familia de células polimorfonucleares (PMN). Los neutrófilos se pueden identificar fácilmente según sus características únicas de tinción en preparaciones histológicas o citológicas de hematoxilina y eosina (H&E). Los neutrófilos normalmente se encuentran en el torrente sanguíneo, pero son uno del primer grupo de células inflamatorias que migran hacia los sitios de inflamación durante la fase inicial (es decir, aguda) de la inflamación, principalmente como resultado de infección o cáncer. Típicamente, los neutrófilos primero migran a través de los vasos sanguíneos, y después a través de tejidos intersticiales, siguiendo señales químicas (por ejemplo, interleuquina-8 (IL-8), interferón gamma (IFN-gamma), y C5a) que se originan en el sitio de la inflamación. "Neutropenia" se refiere a la presencia de bajos recuentos de neutrófilos, que puede resultar de un trastorno congénito (genético), se puede desarrollar debido a otras afecciones, como en el caso de anemia aplásica o algunos tipos de leucemia. Ciertas medicaciones, tal como agentes quimioterapéuticos, también pueden producir neutropenia. La neutropenia predispone fuertemente a infección. La neutropenia también puede resultar de la colonización de parásitos neutrofilicos.

Mediante "aumentar" o "aumentando" o "incrementar" o "incrementando" o "estimular" o "estimulando" se refiere en general a la capacidad de uno o agentes o composiciones para producir o causar una mayor respuesta fisiológica (es decir, efectos posteriores) en una célula, comparada con la respuesta causada o bien por ningún polipéptido YRS o una molécula/composición control. Una respuesta fisiológica medible puede incluir mayor crecimiento, expansión o migración celulares, entre otros aparentes desde el entendimiento de la técnica y la descripción en el presente documento. Entre otros métodos conocidos en la técnica, los ensayos de formación de colonias *in vitro* representan una manera de medir respuestas celulares a agentes divulgados en el presente documento. Una cantidad "incrementada" o "aumentada" según la presente divulgación típicamente es una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir un aumento que es 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces) (incluyendo todos los números enteros y comas decimales entre medias y por encima de 1), por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 etc.) la cantidad producida por sin polipéptido YRS (la ausencia de un agente) o una composición control.

El término "reducir" se puede relacionar en general a la capacidad de uno o más polipéptidos YRS de la presente divulgación a "disminuir" una respuesta fisiológica o celular relevante, tal como un síntoma de una enfermedad o afección (por ejemplo, inflamación pulmonar, etc.), medida según técnicas rutinarias en el arte diagnóstico. Un

ejemplo específico de una respuesta relevante incluye la migración de células inmunitarias (por ejemplo, neutrófilos) a ciertos tejidos, tal como el pulmón. Otras respuestas fisiológicas o celulares relevantes (*in vivo* o *in vitro*) serán aparentes a los expertos en la materia. Una “disminución” en una respuesta puede ser estadísticamente significativas comparada con la respuesta producida por sin polipéptido YRS o una composición control.

“Migración” se refiere a migración celular, un proceso que se puede medir según ensayos *in vitro* rutinarios, como se describe en el presente documento y se sabe en la técnica (véase, por ejemplo, el ejemplo 8). Migración también se refiere a migración *in vivo*, tal como la migración de células de un tejido a otro tejido (por ejemplo, de médula ósea a sangre periférica, o de sangre periférica a tejido pulmonar), o de un sitio en un tejido a otro sitio en el mismo tejido. La migración *in vivo* (por ejemplo, quimiotaxia) con frecuencia se produce en respuesta a infección o tejido dañado/irritado.

“Diferenciación” se refiere al proceso por el que una célula menos especializada (por ejemplo, pluripotente, totipotente, multipotente, etc.) se convierte en un tipo celular más especializado.

“Desensibilización” se refiere en general a la reducción o eliminación de una reacción inmunitaria (patológica) negativa de un organismo a una sustancia o estímulo, tal como un alérgeno o irritante, incluyendo antígenos exógenos, así como “autoantígenos”. Por ejemplo, ciertas enfermedades o afecciones pulmonares se asocian con una reacción negativa a irritantes exógenos tal como humo, de modo que desensibilizar neutrófilos a estos irritantes puede prevenir (es decir, reducir el riesgo de desarrollar) o reducir tales enfermedades o afecciones, y/o sus síntomas.

“Tratamiento” o “tratar” como se usan en el presente documento, incluye cualquier efecto deseable en los síntomas o patología de una enfermedad o afección asociada con trombocitopenia (es decir, niveles de plaquetas reducidos), o un riesgo de desarrollar trombocitopenia, y puede incluir incluso cambios mínimos o mejoras en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o afección que se trata. “Tratamiento” o “tratar” no indica necesariamente erradicación completa o cura de la enfermedad o afección, o síntomas asociados de las mismas. El sujeto que recibe este tratamiento es cualquier animal en necesidad, incluyendo primates, en particular seres humanos, y otros mamíferos tal como equinos, ganado, cerdos y ovejas; y aves de corral y mascotas en general. Los marcadores ejemplares de mejora clínica incluyen bien recuentos aumentados de plaquetas, mantenimiento de recuentos normales de plaquetas, y/o números aumentados de megacariocitos, después de la administración de un polipéptido YRS trombopoyético, como se describe en el presente documento.

Mediante “vector” se quiere decir una molécula de polinucleótido, preferiblemente una molécula de ADN derivada, por ejemplo, de un plásmido, bacteriófago, levadura o virus, en la que se puede insertar o clonar un polinucleótido. Un vector preferiblemente contiene uno o más sitios de restricción únicos y puede ser capaz de replicación autónoma en una célula huésped definida incluyendo una célula o tejido diana a una célula o tejido progenitores de los mismos, o ser integrable con el genoma del huésped definido de modo que la secuencia clonada es reproducible. Según esto, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido lineal o circular cerrado, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el/los cromosoma(s) en los que se ha integrado. Un sistema de vectores puede comprender un único vector o plásmido, dos o más vectores o plásmidos, que juntos contiene el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón. La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector se va a introducir. En el caso presente, el vector es preferiblemente uno que es operativamente funcional en una célula bacteriana. El vector también puede incluir un marcador de selección tal como un gen de resistencia a antibiótico que se puede usar para selección de transformantes adecuados.

Los términos “tipo salvaje” y “natural” se usan de forma intercambiable para referirse a un gen o producto génico que tiene las características del gen o producto génico cuando se aísla de una fuente natural. Un gen o producto génico (por ejemplo, un polipéptido) de tipo salvaje es ese que se observa de forma más frecuentemente en una población y, por tanto, se designa arbitrariamente la forma “normal” o “de tipo salvaje” del gen.

### **Polipéptidos tirosil-ARNt trombopoyéticos y variantes de los mismos**

La presente divulgación se refiere en parte a la observación inesperada de que ciertos polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa, incluyendo truncamientos y/o variantes de los mismos, mimetizan y estimulan el proceso trombopoyético natural *in vivo*. Según esto, los polipéptidos trombopoyéticos de la presente divulgación incluyen un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa de longitud completa, además de cualquier fragmento biológicamente activo, o variante o modificación del mismo, de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa, en donde el polipéptido es capaz de estimular trombopoyesis (es decir, formación de plaquetas), proliferación y/o diferenciación de megacariocitos, y/o proliferación de neutrófilos en un sujeto o *in vitro*.

Las aminoacil-ARNt sintetetasas, tal como tirosil-ARNt sintetasa, típicamente catalizan la aminoacilación de ARNt por su aminoácido análogo. Debido a su papel central en unir aminoácidos con tripletes de nucleótidos contenidos en los ARNt, se piensa que las aminoacil-ARNt sintetetasas están entre las primeras proteínas que aparecieron en la evolución. Las tirosil-ARNt sintetetasas en particular pertenecen a la familia de ARNt sintetasa de clase I, que tiene dos motivos de secuencia muy conservados en el sitio activo, HIGH y KMSKS. Las ARNt sintetetasas de clase I aminoacilan en el 2'-OH de un nucleótido de adenosina, y habitualmente son monoméricas o diméricas (una o dos subunidades, respectivamente).

La tirosil-ARNt sintetasa humana está compuesta de tres dominios: 1) un dominio de plegamiento de Rosmann amino-terminal que es responsable de la formación del intermedio E-Tyr-AMP activado y está conservado entre bacterias, arqueas, y eucariotas; 2) un dominio de reconocimiento de anticodón de ARNt que no se ha conservado entre bacterias y eucariotas; y 3) un dominio carboxilo terminal que es único a la tirosil-ARNt sintetasa humana, y cuya estructura primaria es el 49% idéntica a la putativa citoquina humana proteína activadora de monocitos endotelial II, el 50% idéntica al dominio carboxilo terminal de metionil-ARNt sintetasa de *Caenorhabditis elegans*, y el 43% idéntica al dominio carboxilo terminal de Arc1p de *Saccharomyces cerevisiae*.

Los primeros dos dominios de la tirosil-ARNt sintetasa humana son el 53, 36 y 16% idénticos a tirosil-ARNt sintetetasas de *S. cervisiae*, *Methanococcus jannaschii* y *Bacillus stearothermophilus*, respectivamente. Nueve de quince aminoácidos que se sabe están implicados en la formación del complejo tirosil-adenilato en *B. stearothermophilus* están conservados a través de todos los organismos, mientras que los aminoácidos implicados en el reconocimiento de ARNt<sup>Tyr</sup> no están conservados. Análisis cinéticos de tirosil-ARNt sintetetasas humana recombinante y de *B. stearothermophilus* expresadas en *Escherichia coli* indican que la tirosil-ARNt sintetasa humana aminoacila ARNt<sup>Tyr</sup> humana pero no de *B. stearothermophilus*, y viceversa. Se cree que el dominio carboxilo terminal de la tirosil-ARNt sintetasa humana evolucionó de duplicación génica del dominio carboxilo terminal de metionil-ARNt sintetasa y puede dirigir ARNt al sitio activo de la enzima.

Los fragmentos biológicos de tirosil-ARNt sintetetasas eucariotas conectan la síntesis de proteínas a rutas de señalización celular, tal como trombopoyesis. Estos fragmentos se pueden producir de forma natural sea por ajuste alternativo o proteólisis. Por ejemplo, como se proporciona en la presente divulgación, el fragmento N-terminal pro-trombopoyético mini-YRS es capaz de estimular trombopoyesis *in vivo*. Además, ciertas mutaciones en la secuencia del polipéptido YRS de longitud completa confieren actividad trombopoyética aumentada en la secuencia de referencia de tipo salvaje (por ejemplo, Y341A). Los ejemplos de variantes de ajuste truncadas del polipéptido YRS de longitud completa incluyen los polipéptidos SP1-SP5, descritos en las figuras 17-19.

La estructura de mini-YRS humana (es decir, SEQ ID NO: 3 o mini-Tyr), que contiene los dominios tanto catalítico como de reconocimiento de anticodón, se ha descrito a una resolución de 1,18 Å. Mientras que los dominios catalíticos de las enzimas humana y bacteriana se superimponen, la disposición espacial del dominio de reconocimiento del anticodón relativo al dominio catalítico es única en mini-YRS relativa a los ortólogos bacterianos. Sin querer estar unido por ninguna teoría, la orientación única de dominio de reconocimiento del anticodón puede explicar por qué el fragmento mini-YRS es más activo en varias rutas de señalización celular.

Según esto, formas de realización de la presente divulgación contemplan el uso de composiciones que comprenden polipéptidos YRS trombopoyéticos, incluyendo polipéptidos truncados, variantes y/o modificados de los mismos, para estimular la trombopoyesis en un sujeto. Las proteínas variantes abarcadas por la presente divulgación son biológicamente activas, es decir, siguen teniendo la actividad trombopoyética de una secuencia de polipéptido YRS de referencia (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 y 14). Tales variantes pueden resultar de, por ejemplo, polimorfismo genético o de manipulación humana. Como se divulga en el presente documento, las variantes biológicamente activas de un fragmento polipeptídico YRS de referencia tendrán al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, generalmente al menos el 75%, 80%, 85%, habitualmente aproximadamente del 90% al 95% o más, y típicamente aproximadamente el 98% o más de similitud o identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos para una proteína de referencia determinado por programas de alineamiento de secuencia descritos en otra parte en presente documento usando los parámetros por defecto. Como se divulga en el presente documento, una variante biológicamente activa de un polipéptido YRS de referencia se puede diferenciar de esa proteína generalmente en tanto como 200, 100, 50 o 20 residuos de aminoácidos o adecuadamente en tan poco como 1-15 residuos de aminoácidos, tan poco como 1-10, tal como 6-10, tan poco como 5, tan poco como 4, 3, 2 o incluso 1 residuo de aminoácido. En algunas formas de realización divulgadas en el presente documento, un polipéptido YRS se diferencia de las secuencias de referencia en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 y 14 en al menos uno, pero en menos de 15, 10 o 5 residuos de aminoácidos. En otras formas de realización de la presente divulgación, se diferencia de las secuencias de referencia en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 y 14 en al menos un residuo de aminoácido, pero menos del 20%, 15%, 10%, o 5% de los residuos.

Un polipéptido YRS se puede alterar de varias maneras incluyendo sustituciones, deleciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Los métodos para tales manipulaciones generalmente se conocen en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido YRS truncado y/o variante por mutaciones en el ADN. Los métodos para mutagénesis y alteraciones de secuencias de nucleótidos se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 488-492), Kunkel *et al.*, (1987,

- 5 *Methods in Enzymol*, 154: 367-382), Patente en EE UU No. 4.873.192, Watson, J. D. *et al.*, ("Molecular Biology of the Gene", Cuarta Edición, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) y las referencias citadas en los mismos. Se pueden encontrar dirección respecto a sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan a la actividad biológica de la proteína de interés en el modelo de Dayhoff *et al.*, (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.). Los métodos para cribar productos génicos de genotecas combinatorias hechas por mutaciones puntuales o truncamientos, y para cribar genotecas de ADNc para productos génicos que tienen una propiedad seleccionada se conocen en la técnica. Tales métodos son adaptables para cribado rápido de las genotecas generadas por mutagénesis combinatoria de polipéptidos YRS. Se puede usar mutagénesis de conjunto recurrente (REM), una técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, en combinación con el ensayo de cribado para identificar variantes de polipéptido YRS (Arkin y Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7811-7815; Delgrave *et al.*, (1993) *Protein Engineering*, 6: 327-331). Las sustituciones conservadoras, tal como intercambiar un aminoácido con otro que tiene propiedades similares, pueden ser deseables como se discute en más detalle posteriormente.
- 10
- 15 Como se divulga en el presente documento, los polipéptidos YRS truncados y/o variantes trombopoyéticamente activos puede contener sustituciones de aminoácidos conservadoras en varias localizaciones a lo largo de su secuencia, comparados con una secuencia de aminoácidos YRS de referencia (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, o 14). Una "sustitución de aminoácido conservadora" es una en la que un residuo de aminoácido se sustituye con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, que se pueden subclasificar en general como sigue:
- 20
- Ácida: El residuo tiene una carga negativa debido a la pérdida de un ion H a pH fisiológico y el residuo es atraído por solución acuosa de modo que busca las posiciones de superficie en la conformación de un péptido en que está contenido cuando el péptido está en medio acuoso a pH fisiológico. Los aminoácidos que tiene una cadena lateral ácida incluyen ácido glutámico y ácido aspártico.
- 25
- Básica: El residuo tiene una carga positiva debido a su asociación con ion H a pH fisiológico o en una o dos unidades del mismo (por ejemplo, histidina) y el residuo es atraído por solución acuosa de modo que busca las posiciones de superficie en la conformación de un péptido en el que está contenido cuando el péptido está en medio acuoso a pH fisiológico. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral básica incluyen arginina, lisina e histidina.
- 30
- Cargada: Los residuos están cargados a pH fisiológico y, por tanto, incluyen aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas o básica (es decir, ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, lisina e histidina).
- 35
- Hidrofóbica: Los residuos no están cargados a pH fisiológico y el residuo es repelido por solución acuosa de modo que busca las posiciones internas en la conformación de un péptido en el que está contenido cuando el péptido está en medio acuoso. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral hidrofóbica incluyen tirosina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina y triptófano.
- 40
- Neutra/polar: Los residuos no están cargados a pH fisiológico, pero el residuo no está lo suficientemente repelido por soluciones acuosas de modo que buscara las posiciones internas en la conformación de un péptido en el que está contenido cuando el péptido está en medio acuoso. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra/polar incluyen asparragina, glutamina, cisteína, histidina, serina y treonina.
- 45
- Esta descripción también caracteriza ciertos aminoácidos como "pequeños" puesto que sus cadenas laterales no son lo suficientemente grandes, incluso si carecen de grupos polares, para conferir hidrofobicidad. Con la excepción de prolina, los aminoácidos "pequeños" son esos con cuatro carbonos o menos cuando al menos un grupo polar está en la cadena lateral y tres carbonos o menos cuando no. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral pequeña incluyen glicina, serina, alanina y treonina. El aminoácido secundario codificado por gen prolina es un caso especial debido a sus efectos conocidos sobre la conformación secundaria de cadenas peptídicas. La estructura de prolina se diferencia de todos los otros aminoácidos naturales en que su cadena lateral está unida al nitrógeno del grupo  $\alpha$ -amino, así como al carbono  $\alpha$ . Varias matrices de similitud de aminoácidos (por ejemplo, matriz PAM120 y matriz PAM250, divulgadas, por ejemplo, por Dayhoff *et al.*, (1978), A model of evolutionary change in proteins. Matrices for determining distance relationships En M. O. Dayhoff, (ed.), Atlas of protein sequence and structure, Vol. 5, pp. 345-358, National Biomedical Research Foundation, Washington DC; y por Gonnet *et al.*, (*Science*, 256: 14430-1445, 1992), sin embargo, incluyen prolina en el mismo grupo que glicina, serina, alanina y treonina. Según esto, para los fines de la presente divulgación, prolina se clasifica como un aminoácido "pequeño".
- 50
- 55
- El grado de atracción o repulsión requerido para la clasificación como polar o no polar es arbitrario y, por tanto, los aminoácidos específicamente contemplados por la presente divulgación se han clasificado como uno o el otro. La mayoría de los aminoácidos no específicamente nombrados se pueden clasificar en base a comportamiento conocido.
- 60
- Los residuos de aminoácidos se pueden subclasificar además como cíclicos o no cíclicos, y aromáticos o no aromáticos, clasificaciones que se explican por si mismas con respecto a los grupos sustituyentes de la cadena lateral de los residuos, y como pequeño o grande. El residuo se considera pequeño si contiene un total de cuatro
- 65

átomos de carbono o menos, incluyendo el carbono carboxilo, siempre que esté presente un sustituyente polar adicional; tres o menos si no. Los residuos pequeños son, por supuesto, siempre no aromáticos. Dependiendo de sus propiedades estructurales, los residuos de aminoácidos pueden estar en dos o más clases. Para los aminoácidos de proteínas naturales, la subclasificación según este esquema se presenta en la tabla A.

5

**Tabla A**

**Subclasificación de aminoácidos**

Subclases	Aminoácidos
Ácidos	ácido aspártico, ácido glutámico
Básicos	No cíclicos: arginina, lisina; cíclico: histidina
Cargados	ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, lisina, histidina
Pequeños	glicina, serina, alanina, treonina, prolina
Polares/neutros	asparragina, histidina, glutamina, cisteína, serina, treonina
Polares/grandes	asparragina, glutamina
Hidrofóbicos	tirosina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, triptófano
Aromáticos	triptófano, tirosina, fenilalanina
Residuos que influyen la orientación de la cadena	glicina y prolina

10 Las sustituciones de aminoácidos conservadoras también incluyen agrupamientos basados en las cadenas laterales. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparragina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Por ejemplo, es razonable esperar que la sustitución de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o una sustitución similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado no tendrá mayor efecto en las propiedades del polipéptido variante resultante. Si un cambio de aminoácido produce un polipéptido YRS truncado y/o variante funcional se puede determinar fácilmente ensayando su actividad, como se describe en el presente documento (véanse, por ejemplo, los ejemplos 1 y 2). Las sustituciones conservadoras se muestran en la tabla B bajo el encabezamiento de sustituciones ejemplares. Las sustituciones que están en el ámbito de la presente divulgación, en general, se alcanzan seleccionando sustituciones que no se diferencian significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto peptídico en el área de la sustitución, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la masa de la cadena lateral. Después de introducir las sustituciones, las variantes se criban para actividad biológica.

15

20

25

**Tabla B**

30 **Sustituciones de aminoácidos ejemplares**

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser	Ser
Gln	Asn, His, Lys,	Asn
Glu	Asp, Lys	Asp
Gly	Pro	Pro
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleu	Leu
Leu	Norleu, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Ile, Phe	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro	Gly	Gly
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleu	Leu

Alternativamente, los aminoácidos similares para hacer sustituciones conservadoras se pueden agrupar en tres categorías basadas en las cadenas laterales. El primer grupo incluye ácido glutámico, ácido aspártico, arginina,

lisina, histidina, todos los cuales tienen cadenas laterales cargadas; el segundo grupo incluye glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, glutamina, asparragina; y el tercer grupo incluye leucina, isoleucina, valina, alanina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, como se describe en Zubay, G., *Biochemistry*, tercera edición, Wm.C. Brown Publishers (1993).

5 Por tanto, un residuo de aminoácido no esencial predicho en un polipéptido YRS truncado y/o variante típicamente se sustituye con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Alternativamente, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la región codificante de YRS, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes se pueden cribar para una actividad del polipéptido parental para identificar mutantes que retienen esa actividad. Después de la mutagénesis de las secuencias codificantes, el péptido codificado se puede expresar de forma recombinante y la actividad del péptido se puede determinar. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que se puede alterar de la secuencia de tipo salvaje de un polipéptido como se divulga en el presente documento sin anular o alterar sustancialmente una o más de sus actividades. Adecuadamente, la alteración no anula sustancialmente una de estas actividades, por ejemplo, la actividad es al menos el 20%, 40%, 60%, 70%, u 80%, 100%, 500%, 1000% o más del tipo salvaje. Un residuo de aminoácido "esencial" es un residuo que, cuando se altera de la secuencia de tipo salvaje de un polipéptido YRS truncado de referencia, produce la anulación de una actividad de la molécula parental de modo que menos del 20% de la actividad de tipo salvaje está presente. Por ejemplo, tales residuos de aminoácidos esenciales incluyen los que están conservados en polipéptidos YRS a través de diferentes especies, incluyendo esas secuencias que están conservadas en el/los sitio(s) de unión o motivo(s) que estimulan trombopoyesis de polipéptidos YRS de varias fuentes.

Según esto, la presente divulgación también contempla variantes de las secuencias polipeptídicas YRS naturales o sus fragmentos biológicamente activos, en donde las variantes se distinguen de la secuencia natural por la adición, 25 delección o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos. Según la presente divulgación, las variantes mostrarán al menos aproximadamente el 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% de similitud o identidad de secuencia respecto a una secuencia polipeptídica YRS de referencia, por ejemplo, como se muestra en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 y 14. Además, las secuencias que se diferencian de las secuencias nativas o parentales por la adición, delección o sustitución de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 30 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos, pero que retienen las propiedades de una secuencia polipeptídica YRS parental o de referencia se contemplan en la presente divulgación. En ciertas formas de realización de la presente divulgación, la región C-terminal o N-terminal de cualquiera de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 o 14 puede estar truncada en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más aminoácidos, incluyendo todos los números enteros entre medias (por ejemplo, 101, 102, 103, 35 104, 105), siempre que el polipéptido YRS truncado sea capaz de estimular trombopoyesis (es decir, formación de plaquetas), proliferación y/o diferenciación de megacariocitos, y/o proliferación de neutrófilos en un sujeto o *in vitro*.

En algunas formas de realización de la presente divulgación, los polipéptidos variantes se diferencian de una secuencia YRS de referencia en al menos uno, pero en menos de 50, 40, 30, 20, 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3 o 2 residuos de 40 aminoácidos. En otras formas de realización de la presente divulgación, los polipéptidos variantes se diferencian de las secuencias correspondientes de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 o 14 en al menos el 1% pero menos el 20%, 15%, 10% o 5% de los residuos. (Si esta comparación requiere alineamiento, las secuencias se deben alinear para máxima similitud. Las secuencias "en bucles" hacia afuera de delecciones o inserciones, o malos emparejamiento, se consideran diferencias). Las diferencias son, adecuadamente, diferencias o cambios en un residuo no esencial o una 45 sustitución conservadora.

En ciertas formas de realización de la presente divulgación, un polipéptido variante incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 50 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o más de identidad o similitud de secuencia respecto a una secuencia correspondiente a un polipéptido YRS como, por ejemplo, se muestra en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 o 14, y tiene la capacidad para estimular trombopoyesis en un sujeto, estimular la proliferación y/o diferenciación de megacariocitos en un sujeto, y/o estimular la proliferación de neutrófilos en un sujeto. Los ejemplos de variantes de polipéptido YRS según la presente divulgación incluyen, pero no están limitados a, un polipéptido YRS de longitud completa, o un truncamiento o variante de ajuste del mismo, que tiene una o más sustituciones de aminoácidos 55 seleccionadas de una sustitución R93Q, una sustitución I14L, una sustitución N17G, una sustitución L27I, una sustitución A85S, y una sustitución V156L, además de combinaciones de las mismas. Los ejemplos particulares de variantes del polipéptido YRS de la presente divulgación incluyen, pero no están limitados a, un polipéptido YRS que tiene los aminoácidos 1-364 de SEQ ID NO: 1 con una sustitución R93Q, un polipéptido YRS que tiene los aminoácidos 1-353 de SEQ ID NO: 1 con una sustitución I14L, un polipéptido YRS que tiene los aminoácidos 1-353 de SEQ ID NO: 1 con una sustitución N17G, un polipéptido YRS que tiene los aminoácidos 1-353 de SEQ ID NO: 1 con una sustitución L27I, un polipéptido YRS que tiene los aminoácidos 1-353 de SEQ ID NO: 1 con una sustitución A85S, y un polipéptido YRS que tiene los aminoácidos 1-353 de SEQ ID NO: 1 con una sustitución V156L.

Los cálculos de similitud de secuencia o identidad de secuencia entre secuencias (los términos se usan de forma 65 intercambiable en el presente documento) se realizan como sigue. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean para fines de

comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para alineamiento óptimo y las secuencias no homólogas se pueden ignorar para fines de comparación). En ciertas formas de realización de la presente divulgación, la longitud de una secuencia de referencia alineada para fines de comparación es al menos el 30%, preferiblemente el menos el 40%, más preferiblemente al menos el 50%, 60%, e incluso más preferiblemente en al menos el 70%, 80%, 90%, 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Los residuos de aminoácidos o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan después. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición.

El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, considerando el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que se necesita introducir para alineamiento óptimo de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático. En una forma de realización preferida de la presente divulgación, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch, (1970, *J. Mol. Biol.* **48**: 444-453) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>) o bien una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. En aún otra forma de realización preferida de la presente divulgación, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>) usando una matriz NWSgapdna.CMP con un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 o 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. Un conjunto particularmente preferido de parámetros (y el que se debe usar a menos que se especifique otra cosa) son una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización de hueco de 12, penalización extendida de hueco de 4, y una penalización de hueco marco de 5.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (1989, *Cabios*, **4**: 11-17) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4.

Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas descritas en el presente documento se pueden usar como una "secuencia problema" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden realizar usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.*, (1990, *J. Mol. Biol.* **215**: 403-10). Se pueden realizar búsquedas de nucleótidos por BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación. Se pueden realizar búsquedas de proteínas por BLAST con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a moléculas de proteínas de la presente divulgación. Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997, *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST o NBLAST).

Se pueden identificar variantes de un polipéptido YRS cribando bibliotecas combinatorias de mutantes de un polipéptido YRS. Se pueden usar bibliotecas o fragmentos, por ejemplo, fragmentos N terminales, C terminales o internos, de una secuencia que codifica la proteína YRS para generar una población variegada de fragmentos para cribado y posterior selección de variantes de un polipéptido YRS.

Los métodos para cribar productos génicos de bibliotecas combinatorias hechas por mutación puntual o truncamiento, y para cribar genotecas de ADNc para productos génicos que tiene una propiedad seleccionada, se conocen en la técnica. Tales métodos son adaptables para cribado rápido de genotecas generadas por mutagénesis combinatoria de polipéptidos YRS.

La presente divulgación también contempla el uso de proteínas YRS quiméricas o de fusión para estimular trombopoyesis. Como se usa en el presente documento, una "proteína quimérica" o "proteína de fusión" YRS incluye un polipéptido YRS o fragmento polipeptídico unido bien a otro polipéptido YRS (por ejemplo, para crear fragmentos múltiples), a un polipéptido no YRS, o a ambos. Un "polipéptido no YRS" se refiere a un "polipéptido heterólogo" que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una proteína que es diferente de la proteína YRS, y que deriva del mismo organismo o uno diferente. El polipéptido YRS de la proteína de fusión puede corresponder a todo o una parte de una secuencia de aminoácidos YRS biológicamente activa. En ciertas formas de realización de la presente divulgación, una proteína de fusión de YRS incluye al menos una (o dos) parte biológicamente activa de una proteína YRS. Los polipéptidos que forman la proteína de fusión típicamente están unidos extremo C a extremo N, aunque también pueden estar unidos extremo C a extremo C, extremo N a extremo N, o extremo N a extremo C. Los polipéptidos de la proteína de fusión pueden estar en cualquier orden.

5 El compañero de fusión como se divulga en el presente documento se puede diseñar e incluir para esencialmente cualquier fin deseado siempre que no afecten adversamente la actividad trombopoyética del polipéptido. Por ejemplo, en una forma de realización de la presente divulgación, un compañero de fusión puede comprender una secuencia que ayude en expresar la proteína (un potenciador de expresión) a rendimientos mayores que la proteína recombinante nativa. Otros compañeros de fusión se pueden seleccionar de modo que aumenta la solubilidad de la proteína o para permitir que la proteína se dirija a compartimentos intracelulares deseados.

10 La proteína de fusión como se divulga en el presente documento puede incluir una fracción que tiene una alta afinidad por un ligando. Por ejemplo, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión GST-YRS en la que las secuencias YRS se fusionan al extremo C de las secuencias GST. Como otro ejemplo, un polipéptido YRS se puede fusionar a una etiqueta de ocho aminoácidos en el extremo C, tal como una etiqueta L-E-H-H-H-H-H-H (SEQ ID NO: 5). En ciertas formas de realización de la presente divulgación, los aminoácidos 1-364 de un polipéptido YRS se fusionan a una etiqueta 365-L-E-H-H-H-H-H-H-372 (SEQ ID NO: 5) en el extremo C. Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación y/o identificación de un polipéptido YRS. Alternativamente, la proteína de fusión puede ser una proteína YRS que contiene una secuencia señal heteróloga en su extremo N. En ciertas células huéspedes, la expresión y/o secreción de proteínas YRS se puede aumentar mediante el uso de una secuencia señal heteróloga.

20 Más en general, la fusión a secuencias heterólogas, tal como un fragmento Fc, se puede utilizar según la presente divulgación para eliminar características no deseadas o para mejorar las características deseadas (por ejemplo, propiedades farmacocinéticas) de un polipéptido YRS trombopoyético. Por ejemplo, la fusión a una secuencia heteróloga puede aumentar la estabilidad química, disminuir la inmunogenicidad, mejorar el direccionamiento *in vivo*, y/o aumentar la semivida en circulación de un polipéptido YRS trombopoyético.

25 También se puede usar la fusión a secuencias heterólogas para crear proteínas de fusión bifuncionales, tal como proteínas bifuncionales que son no solo capaces de estimular trombopoyesis, proliferación y/o diferenciación de megacariocitos, y/o proliferación de neutrófilos a través del polipéptido YRS, sino que también son capaces de modificar (es decir, estimular o inhibir) otras rutas a través del polipéptido heterólogo. Los ejemplos de tales rutas incluyen, pero no están limitadas a, varias rutas relacionadas con el sistema inmunitario, tal como rutas de activación inmunitarias innatas o adaptativas, o rutas reguladoras de crecimiento celular, tal como hematopoyesis o angiogénesis. En ciertos aspectos de la presente divulgación, el polipéptido heterólogo puede actuar sinérgicamente con el polipéptido YRS para estimular rutas trombopoyéticas relacionadas y/o hematopoyéticas relacionadas en un sujeto. Los ejemplos de polipéptidos heterólogos que se pueden utilizar para crear una proteína de fusión bifuncional según la presente divulgación incluyen, pero no están limitados a, trombopoyetina, citoquinas (por ejemplo, IL-11), quimioquinas, y varios factores de crecimiento hematopoyéticos, además de fragmentos biológicamente activos y/o variantes de los mismos.

40 Las proteínas de fusión se pueden preparar en general usando técnicas estándar. Por ejemplo, secuencias de ADN que codifican los componentes polipeptídicos de una fusión deseada se pueden ensamblar por separado, y ligar en un vector de expresión apropiado. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica un componente polipeptídico se liga, con o sin un enlazador peptídico, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica el segundo componente polipeptídico de modo que los marcos de lectura de las secuencias estén en la misma fase. Esto permite la traducción en una única proteína de fusión que retiene la actividad biológica de ambos polipéptidos componentes.

50 Se puede emplear una secuencia enlazadora peptídica para separar el primer y segundo componentes polipeptídicos por una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliega en sus estructuras secundaria y terciaria, si se desea. Tal secuencia enlazadora peptídica se incorpora en la proteína de fusión usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica. Ciertas secuencias enlazadoras peptídicas se pueden elegir basadas en los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que pudiera interactuar con epítopos funcionales en el primer y segundo polipéptido; y (3) la falta de residuos hidrofóbicos o cargados que pudieran reaccionar con epítopos funcionales del polipéptido. Las secuencias enlazadoras peptídicas preferidas contienen residuos de Gly, Asn y Ser. También se pueden usar otros aminoácidos casi neutros, tal como Thr y Ala en la secuencia enlazadora. Las secuencias de aminoácidos que se pueden emplear provechosamente incluyen las divulgadas en Maratea et al., *Gene* 40:39 46 (1985); Murphy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8258 8262 (1986); patente en EE UU No. 4.935.233 y patente en EE UU No. 4.751.180. La secuencia enlazadora en general puede tener de 1 a 50 aminoácidos de longitud. No se requieren secuencias enlazadoras cuando el primer y segundo polipéptidos tienen regiones de aminoácidos N-terminales no esenciales que se pueden usar para separar los dominios funcionales y prevenir interferencia estérica.

65 Las secuencias de ADN ligadas pueden estar operativamente unidas a elementos reguladores transcripcionales y de traducción adecuados. Los elementos reguladores responsables para la expresión de ADN están localizados en 5' respecto a la secuencia de ADN que codifica el primer polipéptido. De forma similar, los codones de terminación

requeridos para terminar la traducción y señales de terminación de la transcripción están presentes en 3' respecto a la secuencia de ADN que codifica el segundo polipéptido.

En general, los polipéptidos y polipéptidos de fusión (así como sus polinucleótidos codificantes) de la presente divulgación están aislados. Un polipéptido o polinucleótido "aislado" es uno que está retirado de su medio original. Por ejemplo, una proteína natural está aislada si está separada de alguno o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Preferiblemente, tales polipéptidos son al menos aproximadamente el 90% puros, más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% puros y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 99% puros. Un polinucleótido se considera que está aislado si, por ejemplo, se clona en un vector que no es parte del medio natural.

Ciertas formas de realización de la presente divulgación también abarcan dímeros de polipéptidos YRS. Los dímeros pueden incluir, por ejemplo, homodímeros entre dos polipéptidos YRS idénticos, heterodímeros entre dos polipéptidos YRS diferentes (por ejemplo, un polipéptido YRS de longitud completa y un polipéptido YRS truncado), y/o heterodímeros entre un polipéptido YRS y un polipéptido heterólogo. Ciertos heterodímeros, tales como esos entre un polipéptido YRS y un polipéptido heterólogo, pueden ser bifuncionales, como se describe en el presente documento.

Ciertas formas de realización de la presente divulgación también contemplan el uso de polipéptidos YRS modificados, incluyendo modificaciones que mejoran características deseadas de un polipéptido YRS, como se describe en el presente documento. Las modificaciones de polipéptidos YRS de la presente divulgación incluyen derivaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más aminoácidos constituyentes, incluyendo modificaciones de cadena lateral, modificaciones del esqueleto, y modificaciones N- y C-terminales incluyendo acetilación, hidroxilación, metilación, amidación, y la unión de fracciones glucídicas o lipídicas, cofactores, y similares. Las modificaciones ejemplares también incluyen pegilación de un polipéptido YRS (véase, por ejemplo, Veronese y Harris, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 453-456, 2002).

En ciertos aspectos de la presente divulgación, se puede utilizar tecnología de ligación quimioselectiva para modificar polipéptidos YRS truncados de la presente divulgación, tal como unir polímeros en un sitio específico y de forma controlada. Tal tecnología típicamente se basa en la incorporación de anclas quimioselectivas en el esqueleto de la proteína por medios químicos o recombinantes, y posterior modificación con un polímero que lleva un enlazador complementario. Como resultado, el proceso de ensamblaje y la estructura covalente del conjugado proteína-polímero resultante se puede controlar, lo que permite la optimización racional de propiedades de fármacos, tal como eficacia y propiedades farmacocinéticas (véase, por ejemplo, Kochendoerfer, *Current Opinion in Chemical Biology* 9:555-560, 2005).

Los polipéptidos YRS truncados y/o variantes de la presente divulgación se pueden preparar por cualquier procedimiento adecuado que conocen los expertos en la materia, tal como por técnicas recombinantes. Por ejemplo, los polipéptidos YRS se pueden preparar por un procedimiento que incluye los pasos de: (a) preparar una construcción que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido YRS truncado y que está operativamente unida a un elemento regulador; (b) introducir la construcción en una célula huésped; (c) cultivar la célula huésped para expresar el polipéptido YRS truncado; y (d) aislar el polipéptido YRS truncado y/o variante de la célula huésped. En ejemplos ilustrativos, la secuencia de nucleótidos codifica al menos una parte biológicamente activa de una secuencia polipeptídica mostrada en, o derivada de, SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 o 14, o una variante o fragmento biológicamente activa de la misma. Los polipéptidos YRS recombinantes se pueden preparar convenientemente usando protocolos estándar como se describen, por ejemplo, en Sambrook, *et al.*, (1989, *supra*), en particular Secciones 16 y 17; Ausubel *et al.*, (1994, *supra*), en particular Capítulos 10 y 16; y Coligan *et al.*, *Current Protocols in Protein Science* (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1997), en particular Capítulos 1, 5 y 6.

Además de métodos de producción recombinantes, los polipéptidos de la presente divulgación, y fragmentos de los mismos, se pueden producir por síntesis de péptidos directa usando técnicas de fase sólida (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154 (1963)). La síntesis de proteínas se puede realizar usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada se puede lograr, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer). Alternativamente, varios fragmentos pueden sintetizarse químicamente por separado y combinados usando métodos químicos para generar la molécula deseada.

### **Composiciones de polinucleótidos**

La presente divulgación también proporciona polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa de la presente divulgación, incluyendo truncamientos y/o variantes de los mismos, así como composiciones que comprenden tales polinucleótidos.

Como se usa en el presente documento, los términos "ADN" y "polinucleótido" y "ácido nucleico" se refieren a una molécula de ADN que se ha aislado de ADN genómico total de una especie particular. Por tanto, un segmento de ADN que codifica un polipéptido se refiere a un segmento de ADN que contiene una o más secuencias codificantes, con todo está sustancialmente aislada de, o purificada de, ADN genómico total de la especie de la que se obtiene el

segmento de ADN. Incluidos en los términos “segmento de ADN” y “polinucleótido” están segmentos de ADN y fragmentos más pequeños de tales segmentos, y también vectores recombinantes incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagémidos, fagos, virus, y similares.

5 Como entenderán los expertos en la materia, las secuencias polinucleotídicas de esta divulgación pueden incluir secuencias genómicas, secuencias extragenómicas y codificadas por plásmido y segmentos génicos manipulados más pequeños que expresan, o se pueden adaptar para que expresen, proteínas, polipéptidos, péptidos y similares. Tales segmentos pueden estar aislados de forma natural o modificados sintéticamente por la mano del hombre.

10 Como reconocerá el experto en la materia, los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómico, ADNc o sintético) o ARN. Secuencias codificantes o no codificantes adicionales pueden, pero no necesitan, estar presentes en un polinucleótido de la presente divulgación, y un polinucleótido puede, pero no necesita, estar unido a otras moléculas y/o materiales soporte.

15 Los polinucleótidos como se divulgan en el presente documento pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica una tirosil-ARNt sintetasa o una parte de la misma) o pueden comprender una variante, o un equivalente biológico funcional de tal secuencia. Las variantes de polinucleótidos como se divulga en el presente documento pueden contener una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones, como se describe además posteriormente, preferiblemente de modo que la actividad trombofóbica del polipéptido codificado no disminuya sustancialmente relativa al polipéptido no modificado. El efecto en la actividad trombofóbica del polipéptido codificado generalmente se puede evaluar como se describe en el presente documento.

20 En formas de realización adicionales, la presente divulgación proporciona polinucleótidos aislados que comprenden varias longitudes de tramos contiguos de secuencia idéntica a o complementaria a una tirosil-ARNt sintetasa, en donde los polinucleótidos aislados codifican una tirosil ARNt sintetasa truncada como se describe en el presente documento.

25 Las secuencias de nucleótidos ejemplares que codifican los polipéptidos YRS de la presente divulgación abarcan genes YRS de longitud completa, tal como las secuencias de polinucleótidos de SEQ ID NO: 4, 7, 9, 11, 13 y 15, así como partes de las secuencias de nucleótidos de longitud completa o sustancialmente de longitud completa de los genes YRS o sus transcritos o copias de ADN de estos transcritos. Partes de una secuencia de nucleótidos de YRS pueden codificar partes o segmentos de polipéptido que retienen la actividad biológica del polipéptido de referencia.

30 Una parte de una secuencia de nucleótidos de YRS que codifica un fragmento biológicamente activo de un polipéptido YRS puede codificar al menos aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 300 o 400 residuos de aminoácidos contiguos, o casi hasta el número total de aminoácidos presentes en un polipéptido YRS de longitud completa. Se entenderá fácilmente que “longitudes intermedias”, en este contexto y en todos los otros contextos usados en el presente documento, significa cualquier longitud entre los valores citados, tal como 101, 102, 103, etc.; 151, 152, 153, etc.; 201, 202, 203, etc.

35 Los polinucleótidos de la presente divulgación, independientemente de la longitud de la secuencia codificante misma, se pueden combinar con otras secuencias de ADN, tal como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios múltiples de clonación, otros segmentos codificantes, y similares, de modo que su longitud global puede variar considerablemente. Por tanto, se contempla que se pueda emplear un fragmento de polinucleótido de casi cualquier longitud, estando la longitud total preferiblemente limitada por el caso de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante pretendido.

40 La presente divulgación también contempla variantes de las secuencias de nucleótidos de YRS. Las variantes de ácido nucleico pueden ser naturales, tal como variantes alélicas (mismo locus), homólogos (diferente locus), y ortólogos (diferente organismo) o pueden ser no naturales. Las variantes naturales tal como estas se pueden identificar con el uso de técnicas de biología molecular bien conocidas como, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación como se sabe en la técnica. Las variantes no naturales se pueden hacer por técnicas de mutagénesis, incluyendo las aplicadas de polinucleótidos, células u organismos. Las variantes pueden contener sustituciones, deleciones, inversiones e inserciones de nucleótidos. La variación se puede producir en cualquiera o ambas de las regiones codificantes y no codificantes. Las variaciones pueden producir sustituciones de aminoácidos tanto conservadoras como no conservadoras (comparadas en el producto codificado). Para secuencias de nucleótidos, las variantes conservadoras incluyen esas secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos de un polipéptido YRS de referencia, tal como las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12 y 14. Las secuencias de nucleótidos variantes como se divulgan en el presente documento también incluyen secuencias de nucleótidos sintéticamente derivadas, tal como las generadas, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida, pero que aún codifican un polipéptido YRS. Generalmente, las variantes de una secuencia de nucleótidos YRS particular como se divulgan en el presente documento tendrán al menos aproximadamente el 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, generalmente al menos aproximadamente el 75%, 80%, 85%, deseablemente aproximadamente del 90% al 95% o más, y más adecuadamente aproximadamente el 98% o más de identidad de secuencia respecto a esa secuencia de

nucleótidos particular determinado por programas de alineamiento de secuencias descritos en otra parte en el presente documento usando los parámetros por defecto.

Se pueden usar secuencias de nucleótidos YRS para aislar correspondientes secuencias y alelos de otros organismos, particularmente otros organismos o microorganismos. Hay métodos fácilmente disponibles en la técnica para la hibridación de secuencias de ácido nucleico. Se pueden aislar secuencias codificantes de otros organismos según técnicas bien conocidas basado en su identidad de secuencia con las secuencias codificantes mostradas en el presente documento. En estas técnicas se usa todo o parte de la secuencia codificante conocida como una sonda que hibrida selectivamente con otras secuencias codificantes de YRS presentes en una población de fragmentos de ADN genómico o fragmentos de ADNc clonados (es decir, genotecas genómicas o de ADNc) de un organismo elegido.

Según esto, la presente divulgación también contempla polinucleótidos que hibridan con secuencias de nucleótidos YRS de referencia, o con sus complementos, en las condiciones de rigurosidad descritas a continuación. Como se usa en el presente documento, el término "hibrida en condiciones de rigurosidad baja, rigurosidad media, rigurosidad alta o rigurosidad muy alta" describe condiciones para hibridación y lavado. Se puede encontrar dirección para realizar reacciones de hibridación en Ausubel *et al.*, (1998, *supra*), Secciones 6.3.1-6.3.6. Se describen métodos acuosos y no acuosos en esa referencia y se puede usar cualquiera. La referencia en el presente documento a condiciones de baja rigurosidad incluye y abarca formamida desde al menos aproximadamente el 1% v/v hasta al menos aproximadamente el 15% v/v y sal desde al menos aproximadamente 1 M hasta al menos aproximadamente 2 M para hibridación a 42°C, y sal desde al menos aproximadamente 1 M hasta al menos aproximadamente 2 M para lavar a 42°C. Las condiciones de baja rigurosidad también pueden incluir seroalbúmina bovina (BSA) al 1%, EDTA 1 mM, NaHPO<sub>4</sub> 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7% para hibridación a 65°C, y (i) SSC 2x, SDS al 0,1%; o (ii) BSA al 0,5%, EDTA 1 mM, NaHPO<sub>4</sub> 40 mM (pH 7,2), SDS al 5% para lavar a temperatura ambiente. Un ejemplo de condiciones de baja rigurosidad incluye hibridación en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6x a aproximadamente 45°C, seguido por dos lavados en SSC 0,2x, SDS al 0,1% a al menos 50°C (la temperatura de los lavados se puede aumentar a 55°C para condiciones de baja rigurosidad). Las condiciones de rigurosidad media incluyen y abarcan formamida desde al menos aproximadamente el 16% v/v hasta al menos aproximadamente el 30% v/v y sal desde al menos aproximadamente 0,5 M hasta al menos aproximadamente 0,9 M para hibridación a 42°C, y sal desde al menos aproximadamente 0,1 M hasta al menos aproximadamente 0,2 M para lavar a 55°C. Las condiciones de rigurosidad media también pueden incluir seroalbúmina bovina (BSA) al 1%, EDTA 1 mM, NaHPO<sub>4</sub> 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7% para hibridación a 65°C, y (i) SSC 2x, SDS al 0,1%; o (ii) BSA al 0,5%, EDTA 1 mM, NaHPO<sub>4</sub> 40 mM (pH 7,2), SDS al 5% para lavar a 60-65°C. Un ejemplo de condiciones de rigurosidad media incluye hibridación en SSC 6x a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en SSC 0,2x, SDS al 0,1% a 60°C. Las condiciones de alta rigurosidad incluyen y abarcan formamida desde al menos aproximadamente el 31% v/v hasta al menos aproximadamente el 50% v/v y sal desde al menos aproximadamente 0,01 M hasta al menos aproximadamente 0,15 M para hibridación a 42°C, y sal desde al menos aproximadamente 0,01 M hasta al menos aproximadamente 0,02 M para lavar a 55°C. Las condiciones de alta rigurosidad también pueden incluir seroalbúmina bovina (BSA) al 1%, EDTA 1 mM, NaHPO<sub>4</sub> 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7% para hibridación a 65°C, y (i) SSC 2x, SDS al 0,1%; o (ii) BSA al 0,5%, EDTA 1 mM, NaHPO<sub>4</sub> 40 mM (pH 7,2), SDS al 5% para lavar a una temperatura superior a 65°C. Un ejemplo de condiciones de alta rigurosidad incluye hibridación en SSC 6x a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en SSC 0,2x, SDS al 0,1% a 65°C.

En ciertas formas de realización de la presente divulgación, un polipéptido YRS está codificado por un polinucleótido que hibrida con una secuencia de nucleótidos divulgada en condiciones de rigurosidad muy alta. Un ejemplo de condiciones de rigurosidad muy alta incluye hibridar en fosfato de sodio 0,5 M, SDS al 7% a 65°C, seguido por uno o más lavados en SSC 2x, SDS al 0,1% a 65°C.

Otras condiciones de rigurosidad se conocen bien en la técnica y un experto en la materia reconocerá que se pueden manipular varios factores para optimizar la especificidad de la hibridación. La optimización de la rigurosidad de los lavados finales puede servir para asegurar un alto grado de hibridación. Para ejemplos detallados, véase, Ausubel *et al.*, *supra* en las páginas 2.10.1 to 2.10.16 y Sambrook *et al.* (1989, *supra*) en las secciones 1.101 a 1.104.

Mientras que los lavados rigurosos típicamente se llevan a cabo a temperaturas desde aproximadamente 42°C a 68°C, el experto en la materia apreciará que otras temperaturas pueden ser adecuadas para condiciones rigurosas. La tasa de hibridación máxima típicamente se produce a aproximadamente de 20°C a 25°C por debajo de la T<sub>m</sub> para la formación de un híbrido ADN-ADN. Se sabe bien en la técnica que la T<sub>m</sub> es la temperatura de fusión, o temperatura a la que dos secuencias de polinucleótidos complementarias se disocian. En la técnica se conocen bien métodos para estimar la T<sub>m</sub> (véase, Ausubel *et al.*, *supra* en la página 2.10.8).

En general, la T<sub>m</sub> de un dúplex de ADN perfectamente apareado se puede predecir como una aproximación mediante la fórmula: T<sub>m</sub> = 81,5 + 16,6 (log<sub>10</sub> M) + 0,41 (%G+C) – 0,63 (% formamida) – (600/longitud) en donde: M es la concentración de Na<sup>+</sup>, preferiblemente en el intervalo de 0,01 molar a 0,4 molar; %G+C es la suma de bases de guanosina y citosina como un porcentaje del número total de bases, en el intervalo entre el 30% y el 75%; % de formamida es el porcentaje la concentración de formamida por volumen; longitud es el número de pares de bases en

el dúplex de ADN. La  $T_m$  de un dúplex de ADN disminuye en aproximadamente  $1^\circ\text{C}$  con cada aumento del 1% en el número de pares de bases aleatoriamente mal apareadas. El lavado generalmente se lleva a cabo a  $T_m - 15^\circ\text{C}$  para alta rigurosidad, o  $T_m - 30^\circ\text{C}$  para rigurosidad moderada.

5 En un ejemplo de un procedimiento de hibridación, una membrana (por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa o una membrana de nailon) que contiene ADN inmovilizado se hibrida durante la noche a  $42^\circ\text{C}$  en tampón de hibridación (formamida desionizada al 50%, SSC 5x, solución de Denhardt 5x (ficoll al 0,1%, polivinilpirrolidona al 0,1% y seroalbúmina bovina al 0,1%), SDS al 0,1% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 200 mg/ml) que contiene una sonda marcada. La membrana se somete después a dos lavados secuenciales de rigurosidad media  
10 (es decir, SSC 2x, SDS al 0,1% durante 15 minutos a  $45^\circ\text{C}$ , seguido por SSC 2x, SDS al 0,1% durante 15 minutos a  $50^\circ\text{C}$ ), seguido por dos lavados secuenciales de mayor rigurosidad (es decir, SSC 0,2x, SDS al 0,1% durante 12 minutos a  $55^\circ\text{C}$  seguido por SSC 0,2x y solución de SDS al 0,1% durante 12 minutos a  $65-68^\circ\text{C}$ ).

15 Se pueden preparar polinucleótidos y fusiones de los mismos, manipulados y/o expresados usando cualquiera de una variedad de técnicas bien establecidas conocidas y disponibles en la técnica. Por ejemplo, secuencias polinucleotídicas que codifican polipéptidos de la presente divulgación, o proteínas de fusión o equivalentes funcionales de los mismos, se pueden usar en moléculas de ADN recombinantes para la expresión directa de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa truncado y/o variante en células huésped apropiadas. Debido a la degeneración inherente del código genético, otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la misma o una secuencia de  
20 aminoácidos funcionalmente equivalente se pueden producir y estas secuencias se pueden usar para clonar y expresar un polipéptido determinado.

25 Como entenderán los expertos en la materia, puede ser ventajoso en algunos casos producir secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que poseen codones no naturales. Por ejemplo, se pueden seleccionar codones preferidos por un huésped procarionta o eucariota particular para aumentar la tasa de expresión de proteína o para producir un transcrito de ARN recombinante que tiene propiedades deseables, tal como una semivida que es más larga que la de un transcrito generado de la secuencia natural.

30 Además, las secuencias polinucleotídicas de la presente divulgación se pueden manipular usando métodos generalmente conocidos en la técnica para alterar secuencias codificantes de polipéptidos por una variedad de razones, incluyendo, pero no limitadas a, alteraciones que modifican la clonación, procesamiento, expresión y/o actividad del producto génico.

35 Para expresar un polipéptido deseado, se puede insertar una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, o un equivalente funcional, en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Se pueden usar métodos que conocen bien los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen las secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos de control de transcripción y traducción apropiados. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. Tales técnicas se describen en Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1989), y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1989).  
40

45 Se conocen una variedad de sistemas vector de expresión/huésped y se pueden utilizar para contener y expresar secuencias de polinucleótidos. Estos incluyen, pero no están limitados a, microorganismos tal como bacterias transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófagos, plásmidos o cósmidos recombinantes; levaduras transformadas con vectores de expresión de levaduras; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transformados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales.  
50

Los "elementos de control" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión son esas regiones no traducidas del vector --potenciadores, promotores, regiones no traducidas en 5' y 3'-- que interactúan con proteínas celulares del huésped para llevar a cabo transcripción y traducción. Tales elementos pueden variar en su potencia y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y huésped utilizado, se puede usar cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, se pueden usar promotores inducibles tal como el promotor LacZ híbrido del fagémido PBLUESCRIPT (Stratagene, La Jolla, Calif.) o el plásmido PSPORT1 (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.) y similares. En sistemas de células de mamífero, promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos son generalmente preferidos. Si es necesario para generar una línea celular que contenga múltiples copias de la secuencia que codifica un polipéptido, vectores basados en SV40 o EBV se pueden usar ventajosamente con un marcador seleccionable apropiado.  
55  
60

En sistemas bacterianos, un número de vectores de expresión se pueden seleccionar dependiendo del uso pretendido para el polipéptido expresado. Por ejemplo, cuando se necesitan grandes cantidades, se pueden usar vectores que dirigen altos niveles de expresión de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no están limitados a, los vectores de clonación y expresión multifuncionales de *E. coli* tal como BLUESCRIPT (Stratagene), en el que la secuencia que codifica el polipéptido de interés se puede ligar en el vector  
65

- 5 en el mismo marco de lectura que las secuencias para la Met amino-terminal y los posteriores 7 residuos de  $\beta$ -galactosidasa de modo que se produce una proteína híbrida; vectores pIN (Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264:5503-5509 (1989)); y similares. También se pueden usar vectores pGEX (Promega, Madison, Wis.) para expresar polipéptidos exógenos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente de células lisadas por adsorción a bolas de glutatión-agarosa seguido por elución en presencia de glutatión libre. Se pueden diseñar las proteínas hechas en tales sistemas para que incluyan sitios de corte de proteasas heparina, trombina, o factor XA de modo que el polipéptido de interés clonado se pueda liberar de la fracción GST a voluntad.
- 10 En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, se pueden usar un número de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tal como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH. Para revisiones, véase, Ausubel *et al.* (supra) y Grant *et al.*, *Methods Enzymol.* 153:516-544 (1987).
- 15 En casos donde se usan vectores de expresión vegetales, la expresión de las secuencias que codifican polipéptidos pueden estar dirigidas por cualquiera de un número de promotores. Por ejemplo, promotores víricos como los promotores 35S y 19S de CaMV se pueden usar solos o en combinación con la secuencia líder omega de TMV (Takamatsu, *EMBO J.* 6:307-311 (1987)). Alternativamente, se pueden usar promotores vegetales tal como promotores de la subunidad pequeña de RUBISCO o de proteínas de choque térmico (Coruzzi *et al.*, *EMBO J.* 3:1671-1680 (1984); Broglie *et al.*, *Science* 224:838-843 (1984); y Winter *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105 (1991)). Estas construcciones se pueden introducir en células vegetales por transformación directa de ADN o transfección mediada por patógeno. Tales técnicas se describen en un número de revisiones generalmente disponibles (véase, por ejemplo, Hobbs en McGraw Hill, *Yearbook of Science and Technology*, pp. 191-196 (1992)).
- 20 También se puede usar un sistema de insecto para expresar un polipéptido de interés. Por ejemplo, en uno de tales sistemas, se usa el virus de la poliedrosis nuclear de *Autografa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. Las secuencias que codifican el polipéptido se pueden clonar en una región no esencial del virus, tal como el gen de la poliedrina, y colocar bajo el control del promotor de la poliedrina. La inserción con éxito de la secuencia que codifica el polipéptido hará el gen de la poliedrina inactivo y producirá virus recombinante que carece de proteína de cubierta. Los virus recombinantes se pueden usar después para infectar, por ejemplo, células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia* en las que se puede expresar el polipéptido de interés (Engelhard *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:3224-3227 (1994)).
- 25 En células huéspedes de mamíferos, un número de sistemas de expresión víricos están generalmente disponibles. Por ejemplo, en casos donde se usa un adenovirus como un vector de expresión, las secuencias que codifican un polipéptido de interés se pueden ligar en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste en el promotor tardío y secuencia líder tripartita. La inserción en una región no esencial E1 o E3 del genoma vírico se puede usar para obtener un virus viable que es capaz de expresar el polipéptido en células huésped infectadas (Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:3655-3659 (1984)). Además, se pueden usar potenciadores de transcripción, tal como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV) o la región potenciadora/promotora inmediata/temprana del citomegalovirus (CMV) para aumentar la expresión en células huésped de mamífero.
- 30 También se pueden usar señales de iniciación específicas para lograr la traducción más eficaz de secuencias que codifican un polipéptido de interés. Tales señales el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En casos donde las secuencias que codifican el polipéptido, su codón de iniciación y secuencias anteriores se insertan en el vector de expresión apropiado, puede no ser necesario señales de control de transcripción o traducción adicionales. Sin embargo, en casos donde solo la secuencia codificante, o una parte de la misma, se inserta, se deben suministrar señales de control de traducción exógenas incluyendo el codón de iniciación ATG. Además, el codón de iniciación debe estar en el marco de lectura correcto para asegurar la traducción del inserto entero. Los elementos de traducción y codones de iniciación exógenos pueden ser de varios orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión se puede aumentar mediante la inclusión de potenciadores que sean apropiados para el sistema celular particular que se usa, tales como los descritos en la bibliografía (Scharf. *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 20:125-162 (1994)).
- 35 Además, se puede elegir una cepa de células huésped por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada de la manera deseada. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no están limitadas a, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. También se puede usar procesamiento postraduccional que corta una forma "prepro" de la proteína para facilitar la inserción, plegamiento y/o función correctos. Diferentes células huésped tal como CHO, HeLa, MDCK, HEK293 y W138, que tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades postraduccionales, se pueden elegir para asegurar la modificación y procesamiento correctos de la proteína exógena.
- 40 Para producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, generalmente se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, líneas celulares que expresan establemente un polinucleótido de interés se pueden transformar usando vectores de expresión que pueden contener orígenes víricos de replicación y/o elementos de expresión endógenos y un gen de marcador seleccionable en el mismo vector o uno separado. Después de la
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

introducción del vector, las células se pueden dejar crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarlas a medio selectivo. El fin del marcador seleccionable es otorgar resistencia para selección, y su presencia permite crecimiento y recuperación de células que expresan con éxito las secuencias introducidas. Los clones resistentes de células establemente transformadas se pueden hacer proliferar usando técnicas de cultivo celular apropiadas al tipo celular.

Se puede usar cualquier número de sistemas de selección para recuperar líneas celulares transformadas. Estos incluyen, pero no están limitados a, los genes de la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., *Cell* 11:223-232 (1977)) y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., *Cell* 22:817-823 (1990)) que se pueden emplear en células tk- o aprt-, respectivamente. Además, se puede usar resistencia a antimetabolito, antibiótico o herbicida como la base para la selección; por ejemplo, dhfr que otorga resistencia a metotrexato (Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:3567-70 (1980)); npt, que otorga resistencia a los aminoglucósidos, neomicina y G-418 (Colbere-Garapin et al., *J. Mol. Biol.* 150:1-14 (1981)); y als o pat, que otorgan resistencia a clorsulfuron y fosfinotricina acetiltransferasa, respectivamente (Murry, supra). Se han descrito genes seleccionables adicionales, por ejemplo, trpB, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:8047-51 (1988)). El uso de marcadores visibles ha ganado popularidad con tales marcadores como antocianinas,  $\beta$ -glucuronidasa y su sustrato GUS, y luciferasa y su sustrato luciferina, que son muy usados no solo para identificar transformantes, sino también para cuantificar la cantidad de expresión de proteína transitoria o estable atribuible a un sistema de vector específico (Rhodes et al., *Methods Mol. Biol.* 55:121-131 (1995)).

Una variedad de protocolos para detectar y medir la expresión de productos codificados por polinucleótidos, usando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos para el producto se conocen en la técnica. Los ejemplos incluyen enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), y separación celular activada por fluorescencia (FACS). Estos y otros ensayos se describen, entre otros sitios, en Hampton et al., *Serological Methods, a Laboratory Manual* (1990) y Maddox et al., *J. Exp. Med.* 158:1211-1216 (1983).

Los expertos en la materia conocen una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación y se pueden usar en varios ensayos de ácido nucleico y aminoácidos. Los medios para producir sondas de hibridación o PCR marcadas para detectar secuencias relacionadas con polinucleótidos incluyen oligomarcaje, desplazamiento de la mella, marcate terminal o amplificación por PCR usando un nucleótido marcado. Alternativamente, las secuencias, o cualquier parte de las mismas se pueden clonar en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Tales vectores se conocen en la técnica, están comercialmente disponibles, y se pueden usar para sintetizar sondas de ARN *in vitro* por adición de una ARN polimerasa apropiada tal como T7, T3 o SP6 y nucleótidos marcados. Estos procedimientos se pueden realizar usando una variedad de kits comercialmente disponibles. Las moléculas indicadoras o marcadores adecuados, que se pueden usar incluyen radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes, o cromógenos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas, y similares.

Se pueden cultivar células huésped transformadas con una secuencia polinucleotídica de interés en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante se puede secretar o estar contenida intercelularmente dependiendo en la secuencia y/o el vector usados. Como entenderán los expertos en la materia, se pueden diseñar vectores de expresión que contienen polinucleótidos de la presente divulgación para que contengan secuencias señal que dirigen la secreción del polipéptido codificado a través de la membrana celular procariota o eucariota. Se pueden usar otras construcciones recombinantes para unir secuencias que codifican un polipéptido de interés a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio polipeptídico que facilitará la purificación de proteínas solubles.

### **Composiciones de anticuerpos, fragmentos de los mismos y otros agentes de unión**

Según otro aspecto, la presente divulgación proporciona además agentes de unión, tal como anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que muestran unión inmunológica a un polipéptido divulgado en el presente documento, o a una parte, variante o derivado del mismo, y métodos de usar los mismos. Preferiblemente, tales agentes de unión son eficaces para modular uno o más de las actividades no canónicas mediadas por un polipéptido YRS de la presente divulgación, o para detectar la presencia o ausencia de polipéptidos YRS seleccionados (por ejemplo, truncamientos, variantes de ajuste alternativo, mutantes) en una muestra, tal como una muestra biológica obtenida de un sujeto.

Por ejemplo, ciertas formas de realización de la presente divulgación contemplan un método de identificar o caracterizar un polipéptido YRS en un sujeto, que comprende obtener una muestra biológica de un sujeto, poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo o fragmento de antígeno específicamente se une a un polipéptido YRS de la presente divulgación, y detectar la presencia o ausencia del anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, unido, identificando o caracterizando de esta manera el polipéptido YRS en un sujeto. En ciertos aspectos de la presente divulgación, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une específicamente a un cierto polipéptido YRS variante o truncado, tal como un mutante YRS seleccionado o variante de ajuste alternativo, pero no se une específicamente a otros polipéptidos YRS, tal como un polipéptido YRS, de tipo salvaje, de longitud completa.

Se dice que un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se “une específicamente”, “une inmunológicamente” y/o es “inmunológicamente reactivo” con un polipéptido de la presente divulgación si reacciona a un nivel detectable (en, por ejemplo, un ensayo ELISA) con el polipéptido, y no reacciona detectablemente con polipéptidos no relacionados en condiciones similares.

Unión inmunológica, como se usa en este contexto, generalmente se refiere a las interacciones no covalentes del tipo que se producen entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es específica. La fuerza, o afinidad de interacciones de unión inmunológica se puede expresar en términos de la constante de disociación ( $K_d$ ) de la interacción, en donde una  $K_d$  menor representa una afinidad mayor. Las propiedades de unión inmunológica de los polipéptidos seleccionados se pueden cuantificar usando métodos bien conocidos en la técnica. Uno de tales métodos supone medir las velocidades de formación y disociación de complejos sitio de unión a antígeno/antígeno, en donde esas velocidades dependen de las concentraciones de los compañeros del complejo, la afinidad de la interacción, y de los parámetros geométricos que influyen igualmente la velocidad en ambas direcciones. Por tanto, se pueden determinar tanto la “constante de velocidad de asociación” ( $K_{on}$ ) y la “constante de velocidad de disociación” ( $K_{off}$ ) por cálculo de las concentraciones y las velocidades reales de asociación y disociación. La proporción de  $K_{off}/K_{on}$  permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual, por tanto, a la constante de disociación  $K_d$ . Véase, en general, Davies *et al.* (1990) *Annual Rev. Biochem.* 59:439-473.

Un “sitio de unión a antígeno” o “parte de unión” de un anticuerpo se refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión al antígeno está formado por residuos de aminoácidos de las regiones variables (“V”) N-terminales de las cadenas pesada (“H”) y ligera (“L”). Tres tramos muy divergentes en las regiones V de las cadenas pesada y ligera se denominan “regiones hipervariables” que se interponen entre tramos flanqueantes más conservados conocidos como “regiones marco” o “FR”. Por tanto, el término “FR” se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran de forma natural entre y adyacentes a regiones hipervariables en inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada se disponen relativas entre sí en el espacio tridimensional para formar una superficie de unión a antígeno. La superficie de unión a antígeno es complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno unido, y las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesada y ligera se denominan “regiones determinantes de complementariedad” o “CDR”.

Un agente de unión puede ser, por ejemplo, un ribosoma, con o sin un componente peptídico, una molécula de ARN o un polipéptido. En una forma de realización preferida de la presente divulgación, un agente de unión es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Se pueden preparar anticuerpos por cualquiera de una variedad de técnicas que conocen los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. En general, se pueden producir anticuerpos por técnicas de cultivo celular, incluyendo la generación de anticuerpos monoclonales como se describe en el presente documento, o a través de transfección de genes de anticuerpo en huéspedes bacterianos o de células de mamíferos adecuados, para permitir la producción de anticuerpos recombinantes. En una técnica, un inmunógeno que comprende el polipéptido se inyecta inicialmente en cualquiera de una amplia variedad de mamíferos (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, oveja o cabras). En este paso, los polipéptidos de esta divulgación pueden servir como el inmunógeno sin modificación. Alternativamente, en particular para polipéptidos relativamente cortos, se puede provocar una respuesta inmunitaria superior si el polipéptido se une a una proteína portadora, tal como seroalbúmina bovina o hemocianina de lapa californiana. El inmunógeno se inyecta en el huésped animal, preferiblemente según un programa predeterminado que incorpora una o más inmunizaciones de recuerdo, y los animales se sangran periódicamente. Se pueden purificar después anticuerpos policlonales específicos para el polipéptido de tales antisueros mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad usando el polipéptido acoplado a un soporte sólido adecuado.

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales específicos para un polipéptido de interés, por ejemplo, usando la técnica de Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976, y mejoras a la misma. Brevemente, estos métodos implican la preparación de líneas celulares inmortales capaces de producir anticuerpos que tienen la especificidad deseada (es decir, reactividad con el polipéptido de interés). Tales líneas celulares se pueden producir, por ejemplo, de células de bazo obtenidas de un animal inmunizado como se ha descrito anteriormente. Las células de bazo se immortalizan después, por ejemplo, por fusión con un compañero de fusión de célula de mieloma, preferiblemente uno que es singénico con el animal inmunizado. Se pueden emplear una variedad de técnicas de fusión. Por ejemplo, las células de bazo y las células de mieloma se pueden combinar con un detergente no iónico durante unos pocos minutos y después sembrar a baja densidad en un medio selectivo que soporta el crecimiento de células híbridas, pero no células de mieloma. Una técnica de selección preferida usa selección con HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Después de un tiempo suficiente, habitualmente aproximadamente de 1 a 2 semanas, se observan colonias de híbridos. Se seleccionan colonias individuales y sus sobrenadantes de cultivo se ensayan para actividad de unión contra el polipéptido. Se prefieren hibridomas que tienen alta reactividad y especificidad.

Se pueden aislar anticuerpos monoclonales de los sobrenadantes de colonias de hibridoma en crecimiento. Además, se pueden emplear varias técnicas para aumentar el rendimiento, tal como inyección de la línea de células de

5 hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado adecuado, tal como un ratón. Los anticuerpos monoclonales se pueden recoger después del fluido ascítico o la sangre. Se pueden eliminar contaminantes de los anticuerpos por técnicas convencionales, tal como cromatografía, filtración en gel, precipitación y extracción. Los polipéptidos de esta divulgación se pueden usar en el proceso de purificación en, por ejemplo, un paso de cromatografía de afinidad.

10 En la técnica se conocen un número de moléculas terapéuticamente útiles que comprenden sitios de unión a antígenos que son capaces de mostrar propiedades de unión inmunológica de una molécula de anticuerpo. La enzima proteolítica papaina preferentemente corta moléculas de IgG para dar varios fragmentos, dos de los cuales (los fragmentos "F(ab)") comprenden cada uno un heterodímero covalente que incluye un sitio de unión a antígeno intacto. La enzima pepsina es capaz de cortar moléculas de IgG para proporcionar varios fragmentos, incluyendo el fragmento "F(ab)<sub>2</sub>" que comprende ambos sitios de unión a antígeno. Se puede producir un fragmento "Fv" por corte proteolítico preferente de una molécula de inmunoglobulina IgM, y en raras ocasiones IgG o IgA. Sin embargo, los fragmentos Fv se derivan más comúnmente usando técnicas recombinantes conocidas en la técnica. El fragmento Fv incluye un heterodímero V<sub>H</sub>:V<sub>L</sub> no covalente que incluye un sitio de unión a antígeno que retiene mucho de las capacidades de reconocimiento y unión a antígeno de la molécula de anticuerpo nativa. Inbar *et al.* (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69:2659-2662; Hochman *et al.* (1976) *Biochem* 15:2706-2710; y Ehrlich *et al.* (1980) *Biochem* 19:4091-4096.

20 Un polipéptido Fv monocatenario ("sFv") es un heterodímero V<sub>H</sub>:V<sub>L</sub> covalentemente unido que se expresa de una fusión de genes que incluye genes que codifican V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> unidos por un enlazador que codifica péptido. Huston *et al.* (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85(16):5879-5883. Se han descrito un número de métodos para discernir estructuras químicas para convertir las cadenas polipeptídicas ligera y pesada naturalmente agregadas --pero químicamente separadas-- de la región V de un anticuerpo en una molécula sFv que se plegará a una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno. Véase, por ejemplo, las patentes en EE UU No. 5.091.513 y 5.132.405 a Huston *et al.*; y la patente en EE UU No. 4.946.778 a Ladner *et al.*

30 Cada una de las moléculas anteriormente descritas incluye un conjunto de CDR de la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente interpuestas entre un conjunto de FR de cadena pesada y cadena ligera para proporcionar soporte a las CDR y define la relación espacial de las CDR relativas entre sí. Como se usa en el presente documento, el término "conjunto de CDR" se refiere a las tres regiones hipervariables de una región V de cadena pesada o ligera. Procediendo del extremo N de una cadena pesada o ligera, estas regiones se indican como "CDR1", "CDR2" y "CDR3" respectivamente. Por tanto, un sitio de unión a antígeno incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de una región V de una cadena pesada y una ligera. Un polipéptido que comprende una única CDR (por ejemplo, una CDR1, CDR2 o CDR3) se denomina en el presente documento una "unidad de reconocimiento molecular". El análisis cristalográfico de un número de complejos antígeno-anticuerpo ha demostrado que los residuos de aminoácidos de las CDR forman contacto extenso con el antígeno unido, en donde el contacto con el antígeno más extenso es con la CDR3 de la cadena pesada. Por tanto, las unidades de reconocimiento molecular son principalmente responsables de la especificidad de un sitio de unión a antígeno.

45 Como se usa en el presente documento, el término "conjunto de FR" se refiere a las cuatro secuencias de aminoácidos flanqueantes que enmarcan las CDR de un conjunto de CDR de una región V de una cadena pesada o ligera. Algunos residuos FR pueden entrar en contacto con antígeno unido; sin embargo, las FR son principalmente responsables para el plegamiento de la región V en el sitio de unión a antígeno, particularmente los residuos FR directamente adyacentes a las CDR. En las FR, ciertos residuos de aminoácidos y ciertas características estructurales están muy conservadas. A este respecto, todas las secuencias de regiones V contienen un bucle disulfuro interno de aproximadamente 90 residuos de aminoácidos. Cuando la región V se pliega en un sitio de unión, las CDR se muestran como motivos de bucle en proyección que forman una superficie de unión antígeno. En general se reconoce que hay regiones estructurales conservadas de las FR que influyen la forma plegada de los bucles de CDR en ciertas estructuras "canónicas" --independientemente de la secuencia de aminoácidos de CDR precisa. Además, se sabe que ciertos residuos FR participan en contactos interdominio no covalentes que estabilizan la interacción de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo.

55 Se han descrito un número de moléculas de anticuerpo "humanizado" que comprenden un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedores y sus CDR asociadas fusionadas a dominios constantes humanos (Winter *et al.* (1991) *Nature* 349:293-299; Lobuglio *et al.* (1989) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220-4224; Shaw *et al.* (1987) *J Immunol.* 138:4534-4538; y Brown *et al.* (1987) *Cancer Res.* 47:3577-3583), CDR de roedor injertadas en una FR soporte humana antes de la fusión con un dominio constante de anticuerpo humano apropiado (Riechmann *et al.* (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven *et al.* (1988) *Science* 239:1534-1536; y Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525), y CDR de roedores soportadas por FR de roedores recombinantemente recubiertas (publicación de patente europea No. 519.596, publicada el 23 de diciembre, 1992). Estas moléculas "humanizadas" se diseñan para minimizar respuesta inmunológica no deseada hacia moléculas de anticuerpo antihumanas de roedor que limita la duración y eficacia de las aplicaciones terapéuticas de estas fracciones en receptores humanos.

Como se usan en el presente documento, los términos "FR recubiertas" y "FR recombinantemente recubiertas" se refiere a la sustitución selectiva de residuos FR de, por ejemplo, una región V de cadena pesada o ligera de roedor, con residuos FR humanos para proporcionar una molécula xenógena que comprende un sitio de unión a antígeno que retiene sustancialmente toda la estructura de plegamiento de polipéptido de FR nativa. Las técnicas de recubrimiento se basan en el entendimiento de que las características de unión del ligando de un sitio de unión a antígeno están determinadas principalmente por la estructura y disposición relativa de los conjuntos de CDR de la cadena pesada y ligera en la superficie de unión a antígeno. Davies *et al.* (1990) Ann. Rev. Biochem. 59:439-473. Por tanto, la especificidad de unión al antígeno se puede conservar en un anticuerpo humanizado solo en donde las estructuras de las CDR, su interacción entre ellas, y su interacción con el resto de los dominios de la región V se mantienen cuidadosamente. Usando técnicas de recubrimiento, los residuos FR exteriores (por ejemplo, accesibles al solvente) que encuentra fácilmente el sistema inmunitario se sustituyen selectivamente con residuos humanos para proporcionar una molécula híbrida que comprende una superficie recubierta o bien débilmente inmunógena, o sustancialmente no inmunógena.

En otra forma de realización de la presente divulgación, los anticuerpos monoclonales como se divulgan en el presente documento se pueden acoplar a uno o más agentes de interés. Por ejemplo, se puede acoplar (por ejemplo, unir covalentemente) un agente terapéutico a un anticuerpo monoclonal adecuado sea directa o indirectamente (por ejemplo, a través de un grupo enlazador). Una reacción directa entre un agente y un anticuerpo es posible cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleofílico, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o haluro ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo, un haluro) en el otro.

Alternativamente, puede ser deseable acoplar un agente terapéutico y un anticuerpo a través de un grupo enlazador. Un grupo enlazador puede funcionar como un espaciador para separar un anticuerpo de un agente para evitar interferencias con las capacidades de unión. Un grupo enlazador también puede servir para aumentar la reactividad química de un sustituyente en un agente o un anticuerpo, y así aumentar la eficacia de acoplamiento. Un aumento en la reactividad química también puede facilitar el uso de agentes, o grupos funcionales en agentes, que de otra manera no sería posible.

Será evidente para los expertos en la materia que una variedad de reactivos bifuncionales o polifuncionales, tanto homo- como hetero-funcionales (tal como los descritos en el catálogo de Pierce Chemical Co., Rockford, IL), se puede emplear como el grupo enlazador. El acoplamiento se puede realizar, por ejemplo, mediante grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo o residuos glucídicos oxidados. Hay numerosas referencias que describen tal metodología, por ejemplo, la patente en EE UU No. 4.671.958 a Rodwell *et al.*

Donde un agente terapéutico es más potente cuando está libre de la parte de anticuerpo de los inmunoconjugados de la presente divulgación, puede ser deseable usar un grupo enlazador que se corte durante o tras la internalización en una célula. Se han descrito un número de diferentes grupos enlazadores cortables. Los mecanismos para la liberación intracelular de un agente de estos grupos enlazadores incluyen corte por reducción de un enlace disulfuro (por ejemplo, patente en EE UU No. 4.489.014 a Spittler), por irradiación de un enlace fotolábil (por ejemplo, patente en EE UU No. 4.625.014, a Sender *et al.*), por hidrólisis de cadenas laterales de aminoácidos derivadas (por ejemplo, patente en EE UU No. 4.638.045 a Kohn *et al.*), por hidrólisis mediada por complemento de suero (por ejemplo, patente en EE UU No. 4.671.958, a Rodwell *et al.*) e hidrólisis catalizada por ácido (por ejemplo, patente en EE UU No. 4.569.789 a Blattler *et al.*).

Puede ser deseable acoplar más de un agente a un anticuerpo. En una forma de realización de la presente divulgación, múltiples moléculas de un agente se acoplan a una molécula de anticuerpo. En otra forma de realización de la presente divulgación, más de un tipo de agente se puede acoplar a un anticuerpo. Independientemente de la forma de realización particular divulgada en el presente documento, se pueden preparar inmunoconjugados con más de un agente en una variedad de modos. Por ejemplo, se puede acoplar más de un agente directamente a una molécula de anticuerpo, o se pueden usar enlazadores que proporcionan múltiples sitios para la unión.

### **Trombocitopenia y métodos de uso**

Como se ha indicado anteriormente, la presente divulgación, en general, se refiere a métodos de tratar, y/o reducir los riesgos de desarrollar, trombocitopenia u otras afecciones asociadas con recuento de plaquetas disminuido. La trombocitopenia se caracteriza generalmente por recuentos de plaquetas reducidos, comparados con un intervalo normal de recuentos de plaquetas para un sujeto típico. Por ejemplo, trombocitopenia se refiere generalmente a una disminución en el recuento de plaquetas hasta aproximadamente  $100.000/\text{mm}^3$  o menor comparado con un recuento de plaquetas normal. Un recuento de plaquetas normal generalmente varía desde aproximadamente  $150.000 \text{ mm}^3$  hasta aproximadamente  $450.000 \text{ mm}^3$  en un sujeto.

La trombocitopenia con frecuencia no produce signos o síntomas, pero se puede identificar por análisis de sangre rutinario. Si están presentes, los posibles signos y síntomas de trombocitopenia incluyen hematomas fáciles y/o

hemorragia excesiva. Por ejemplo, la hemorragia en la piel puede ser el primer signo de un bajo recuento de plaquetas. Con frecuencia aparecen muchos puntos rojos diminutos (petequias) en la piel en las pantorrillas, y lesiones menores pueden producir pequeños cardenales esparcidos. Además, las encías pueden sangrar, y puede aparecer sangre en heces u orina. Los periodos menstruales pueden ser inhabitualmente pesados. La hemorragia puede ser difícil de parar.

La hemorragia típicamente empeora según disminuye el número de plaquetas. Las personas que tienen muy pocas plaquetas pueden perder grandes cantidades de sangre en el aparato digestivo o pueden desarrollar hemorragia potencialmente mortal en el cerebro incluso aunque no se hayan lesionado. La velocidad a la que se desarrollan los síntomas puede variar dependiendo de la causa de la trombocitopenia.

La trombocitopenia puede ser congénita, adquirida y/o iatrogénica, y puede provenir de una variedad de causas o afecciones fisiológicas subyacentes. Por ejemplo, la trombocitopenia puede resultar generalmente de producción disminuida de plaquetas, destrucción aumentada de plaquetas, consumo de plaquetas, captura/secuestro de plaquetas debido a hiperesplenismo (es decir, bazo agrandado) o hipotermia, y/o de los efectos secundarios de ciertas medicaciones (es decir, trombocitopenia inducida por medicación). Además, se producen formas idiopáticas de trombocitopenia, especialmente en niños, formas transitorias pueden seguir a infecciones víricas (por ejemplo, Epstein-Barr o mononucleosis infecciosa), y mujeres embarazadas pueden desarrollar trombocitopenia leve con frecuencia cuando están cerca del parto.

Los ejemplos de afecciones congénitas asociadas con la producción disminuida (es decir, producción disminuida o deficiente) de plaquetas incluyen síndrome de Wiscott-Aldrich, ingestión materna de tiacidas, trombocitopenia amegacariocítica congénita, síndrome de trombocitopenia y aplasia radial, anemia de Fanconi, síndrome de Bernard-Soulier, anomalía de May-Hegglin, síndrome de plaquetas grises, síndrome de Alport y rubeola neonatal. Los ejemplos de afecciones adquiridas asociadas con la producción disminuida de plaquetas incluyen anemia aplásica, síndrome mielosplásico, infiltración de la médula (por ejemplo, leucemias agudas y crónicas, tumores, cáncer de la médula ósea), linfomas, deficiencias nutricionales (por ejemplo B<sub>12</sub>, ácido fólico), el uso de agentes mielosupresores, el uso de fármacos que influyen directamente la producción de plaquetas (por ejemplo, tiacidas, alcohol, hormonas), exposición a radiación (por ejemplo, terapia de radiación), exposición a sustancias químicas tóxicas (por ejemplo, pesticidas, arsénico, benceno), producción disminuida de trombopoyetina por el hígado en insuficiencia hepática, septicemia bacteriana, y ciertas infecciones víricas (por ejemplo, varicela, paperas, parvovirus, sarampión, dengue, VIH, VHC).

Los ejemplos de afecciones congénitas asociadas con destrucción de plaquetas periféricas aumentada incluyen afecciones no inmunitarias, tal como prematuridad, eritroblastosis fetal, infección; y afecciones inmunitarias, tal como sensibilidad a fármacos, purpura trombocitopénica idiopática (PTI) y PTI materna. Los ejemplos de afecciones adquiridas asociadas con destrucción de plaquetas periféricas aumentada incluyen afecciones no inmunitarias, tal como síndrome hemolítico-urémico, coagulación intravascular diseminada, purpura trombocitopénica trombótica (PTT); afecciones no inmunitarias, tal como trombocitopenia inducida por fármacos (por ejemplo, especialmente con quinina y quinidina), purpura postransfusión, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, trombocitopenia aloinmunitaria neonatal, hemoglobinuria nocturna paroxística, PTI aguda y crónica, septicemia, y alcohol; además del uso de líneas y dispositivos invasivos (por ejemplo, catéteres arteriales o venosos centrales), bombas de globo intra-aórticas, válvulas de corazón prostéticas, así como el uso de terapias relacionadas con heparina.

La trombocitopenia inducida por medicación puede resultar, en particular, de ciertos fármacos, tal como agentes quimioterapéuticos, agentes antiinflamatorios no esteroideos, sulfonamidas, vancomicina, clopidogrel, inhibidores de glucoproteína IIb/IIIa, interferones, ácido valproico, abciximab, linezolid, famotidina, mebeverina, bloqueantes de histamina, agentes alquilantes, heparina, alcohol, agentes quimioterapéuticos antibióticos, carbapenems, ureidopenicilinas, cefazolina, entre otros, conocidos en la técnica. Los ejemplos particulares de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no están limitados a, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbina, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, nitrosurea, dactinomina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión al receptor de estrógeno, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de farnesil-proteína transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, Temazolomida (una forma acuosa de DTIC), o cualquier análogo o derivado variante de los anteriores.

La presente divulgación se refiere en general a métodos de tratar, o reducir los riesgos de desarrollar, trombocitopenia (es decir, recuento de plaquetas disminuido) en un sujeto, tal como en un sujeto que tiene una o más de las enfermedades o afecciones ejemplares divulgadas en el presente documento, entre otras conocidas en la técnica, administrando al sujeto una composición que comprende una concentración trombopoyéticamente eficaz de un polipéptido tirosil-ARNt sintético truncado y/o variante, o un polipéptido modificado del mismo. Las formas de realización de la presente divulgación abarcan métodos de tratamiento pretendidos no solo para aumentar o mejorar el recuento de plaquetas en un sujeto que tiene un recuento de plaquetas reducido, disminuido, anómalo, o bajo, sino para mantener un recuento de plaquetas normal en un sujeto en riesgo de desarrollar recuento de plaquetas bajo. Ciertas formas de realización de la presente divulgación también contemplan el uso de polipéptidos YRS para aumentar el recuento de plaquetas en un donante de plaquetas, incluyendo un donante de otra manera sano (es

decir, un donante con un recuento de plaquetas normal), tal como administrar un polipéptido YRS al donante antes de, durante y/o después del proceso de donación de plaquetas o aféresis.

5 Según esto, ciertas formas de realización de la presente divulgación incluyen métodos para aumentar el recuento de  
 10 plaquetas en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende una concentración  
 trombotocoyéticamente eficaz de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa truncado y/o variante, o un polipéptido  
 modificado del mismo, aumentando de esta manera el recuento de plaquetas en el sujeto. Otras formas de  
 15 realización de la presente divulgación incluyen métodos de mantener un recuento de plaquetas normal en un sujeto,  
 que comprenden administrar al sujeto una composición que comprende una concentración trombotocoyéticamente  
 eficaz de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa truncado y/o variante, tal como en donde el sujeto está en riesgo de  
 desarrollar un bajo recuento de plaquetas. Ciertas formas de realización de la presente divulgación pueden incluir  
 métodos de estimular la trombotocoyesis en un sujeto, tal como administrando al sujeto una composición que  
 comprende una concentración trombotocoyéticamente eficaz de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa truncado y/o  
 20 variante. En ciertos aspectos de la presente divulgación, el sujeto tiene un recuento de plaquetas reducido,  
 disminuido o anómalo, tal como un recuento de plaquetas de aproximadamente  $100.000/\text{mm}^3$  o menor. En ciertos  
 aspectos de la presente divulgación, los polipéptidos YRS divulgados en el presente documento se pueden utilizar  
 para estimular la proliferación y/o diferenciación de megacariocitos y/o neutrófilos en un sujeto.

20 Un sujeto que tiene un recuento de plaquetas reducido también puede estar en riesgo de desarrollar otros problemas  
 asociados con trombotocopenia, tal como sangrar o moretones, hemorragia, hemorragia gastrointestinal, epistaxis  
 (es decir, hemorragia nasal), o hemorragia intracraneal (es decir, hemorragia en el cerebro). Como un ejemplo  
 particular, los pacientes sépticos con trombotocopenia tienen hemorragia aumentada. Según esto, ciertos aspectos  
 de la presente divulgación pueden utilizar las composiciones trombotocoyéticas divulgadas en el presente documento  
 para reducir el riesgo de desarrollar estos tipos de problemas asociados a trombotocopenia, entre otros. En otros  
 25 aspectos de la presente divulgación, el sujeto puede estar en riesgo de desarrollar un recuento de plaquetas  
 reducido, disminuido, o anómalo de otra manera, tal como de una afección adquirida asociada con niveles de  
 plaquetas disminuidas (por ejemplo, ciertas terapias médicas, leucemias, entre otros).

30 En ciertos aspectos de la presente divulgación, los métodos de tratamientos descritos en el presente documento se  
 pueden emplear independientemente de otras modalidades terapéuticas, y puede ser la modalidad terapéutica sola  
 o principal en que se basa para tratar una afección trombotocopénica y/o reducir de otra manera el riesgo no solo de  
 desarrollar trombotocopenia, sino de desarrollar otros problemas médicos asociados con la misma, tal como  
 hemorragia. Por ejemplo, un sujeto que tiene trombotocopenia para la que no hay causa subyacente conocida (por  
 ejemplo, purpura trombotocopénica idiopática), se puede beneficiar de los métodos de tratamiento divulgados en el  
 35 presente documento para aumentar y/o controlar los niveles de plaquetas.

40 En ciertos aspectos de la presente divulgación, los métodos y composiciones de la presente divulgación se pueden  
 emplear como una parte de una terapia de combinación, tal como mediante la administración con otros agentes que  
 pueden estimular rutas trombotocoyéticas y/o hematopoyéticas en un sujeto. Los ejemplos de otros agentes que se  
 pueden usar como parte incluyen trombotocoyetina, citoquinas (por ejemplo, IL-11), quimioquinas, y/o factores de  
 crecimiento implicados en trombotocoyesis o hematopoyesis, incluyendo fragmentos o variantes biológicamente  
 activos de los mismos.

45 En ciertos aspectos de la presente divulgación, los métodos de la presente divulgación se pueden emplear junto con  
 otras modalidades terapéuticas, tal como las implicadas en tratar la afección subyacente que causa la afección  
 asociada con trombotocopenia. Por ejemplo, un sujeto que tiene trombotocopenia amegacariocítica congénita (TAMC)  
 puede someterse finalmente a un procedimiento de trasplante de médula ósea, pero también se puede beneficiar de  
 un tratamiento separado, como se divulga en el presente documento, para o bien aumentar los niveles de plaquetas  
 y/o para mantener los niveles de plaquetas en un intervalo normal. Los polipéptidos trombotocoyéticos de la presente  
 50 divulgación se pueden emplear en este y aspectos similares.

55 En ciertos aspectos de la presente divulgación, los métodos divulgados en el presente documento se pueden  
 emplear en combinación con un sujeto que se somete a otros tratamientos médicos, tal como tratamientos que o  
 bien causan trombotocopenia o aumentan el riesgo de desarrollar trombotocopenia. Por ejemplo, los métodos  
 divulgados en el presente documento se pueden emplear con un sujeto que se somete, un sujeto a punto de  
 someterse, y/o un sujeto que se ha sometido, a terapia de radiación, quimioterapia u otro tipo de tratamiento,  
 incluyendo varios tipos de tratamientos farmacéuticos, como se describe en el presente documento y se sabe en la  
 técnica, ya que se sabe que tales tratamientos reducen el recuento de plaquetas en un sujeto. Según esto, los  
 métodos divulgados en el presente documento se pueden utilizar antes, durante y/o después de otros tratamientos  
 60 médicos para reducir el riesgo de desarrollar trombotocopenia resultante de tales tratamientos, y/o para tratar o  
 mejorar la trombotocopenia resultante de tales tratamientos.

65 En ciertas formas de realización de la presente divulgación, los métodos divulgados en el presente documento se  
 pueden utilizar para tratar o controlar profilácticamente síntomas trombotocopénicos asociados con tales afecciones  
 particulares como se describe en el presente documento y se sabe en la técnica.

**Estimulación de células progenitoras de megacariocitos y métodos de uso**

Los polipéptidos YRS de la presente divulgación también se pueden usar para estimular el crecimiento de células progenitoras de megacariocitos, incluyendo células progenitoras tempranas, es decir, los progenitores de linaje restringido más primitivos del linaje de megacariocitos. Se incluyen métodos de estimular la proliferación de células progenitoras de megacariocitos tempranas, que comprenden incubar un cultivo de células madre hematopoyéticas con un polipéptido tirosil-ARNt sintética durante un tiempo suficiente para permitir la proliferación de las células progenitoras de megacariocitos tempranas, estimulando de esta manera la proliferación de células progenitoras de megacariocitos tempranas. En estas y formas de realización relacionadas como se divulga en el presente documento, los polipéptidos YRS de la presente divulgación se pueden incubar con CMH purificadas, CMH parcialmente purificadas, cultivos de médula ósea completa (por ejemplo, para trasplantes de médula ósea), sangre de cordón umbilical, u otros tipos de cultivo usados en terapias de injerto hematopoyético. Tales métodos pueden producir un cultivo que está enriquecido para células progenitoras de megacariocitos tempranas. También se pueden administrar polipéptidos YRS de la presente divulgación directamente a un sujeto (*in vivo*) para estimular la proliferación de células progenitoras de megacariocitos tempranas en ese sujeto.

“Células madre hematopoyéticas (CMH)” se refiere en general a “células madre” pluripotentes o multipotente que dan lugar a los tipos de células sanguíneas, incluyendo linajes mieloides (por ejemplo, monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas), y linfoides (por ejemplo, células T, células B, células NK), y otros conocidos en la técnica. Las “células madre” típicamente se definen por su capacidad para formar múltiples tipos celulares (es decir, multipotencia) y su capacidad para autorrenovarse. En ciertas formas de realización de la presente divulgación, sin embargo, se pueden incluir progenitores oligopotentes y unipotentes. “Hematopoyesis” se refiere en general al proceso de diferenciación celular o formación de células sanguíneas particulares, especializadas a partir de una CMH.

Las CMH se pueden obtener según métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden encontrar CMH en la médula ósea de adultos, que incluye fémures, cadera, costillas, esternón, y otros huesos. Las CMH se pueden obtener directamente por retirada de la cadera usando una aguja y jeringa, o de la sangre, son frecuencia después de pretratamiento con citoquinas, tal como G-CSF (factores estimulantes de colonias de granulocitos), que inducen que las células se liberen del compartimento de la médula ósea. Otras fuentes para uso clínico y científico incluyen sangre de cordón umbilical, placenta, y sangre periférica modificada. Para fines experimentales, el hígado fetal, bazo fetal y AGM (aorta-gónada-mesonefros) de animales también son fuentes útiles de CMH.

Se pueden identificar CMH según ciertos marcadores fenotípicos o genotípicos. Por ejemplo, se pueden identificar CMH por su pequeño tamaño, falta de marcadores de linaje (lin), baja tinción (población lateral) con colorantes vitales tal como rodamina 123 (rodamina<sup>DULL</sup>, también llamada rho<sup>lo</sup>) o Hoechst 33342, y presencia de varios marcadores antigénicos en su superficie, muchos de los cuales pertenecen al grupo de la serie de diferenciación (por ejemplo, CD34, CD38, CD90, CD133, CD105, CD45, y c-kit, el receptor para factor de células madre). Las CMH son principalmente negativas para los marcadores que típicamente se usan para detectar compromiso de linaje, y, por tanto, son frecuencia se denominan células lin(-). La mayoría de las CMH humanas se pueden caracterizar como CD34<sup>+</sup>, CD59<sup>+</sup>, Thy/CD90<sup>+</sup>, CD38<sup>lo/-</sup>, C-kit/CD117<sup>+</sup> y lin(-). Sin embargo, no todas las células madre están cubiertas por estas combinaciones, ya que ciertas CMH son CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>. También algunos estudios sugieren que las células madre más tempranas pueden carecer de c-kit en la superficie celular. Para CMH humanas, CD133 puede representar un marcador temprano, ya que se ha mostrado que CMH tanto CD34<sup>+</sup> como CD34<sup>-</sup> son CD133<sup>+</sup>.

Para la purificación de CMH lin(-) por citometría de flujo, o FACS, se puede usar una matriz de anticuerpos de marcadores de linaje de sangre maduros para eliminar las células lin(+) o progenitores multipotentes tardíos (PMP), incluyendo, por ejemplo, anticuerpos contra CD13 y CD33 para células mieloides humanas, CD71 para células eritroides humanas, CD19 para células B humanas, CD61 para células megacariocíticas humanas, Mac-1 (CD11b/CD18) para monocitos, Gr-1 para granulocitos, Il7Ra, CD3, CD4, CD5 y CD8 para células T, entre otros conocidos en la técnica. Otros métodos de purificación se conocen en la técnica, tal como los métodos que usan la firma particular de la familia de ‘moléculas de activación de linfocitos de señalización’ (SLAM) de moléculas de superficie celular.

Las CMH, ya sean obtenidas de, o presentes en, sangre de cordón umbilical, médula ósea, sangre periférica, u otra fuente, se pueden hacer crecer o expandir en cualquier medio adecuado, comercialmente disponible o personalizado, con o sin suero, según se desee (véase, por ejemplo, Hartshorn *et al.*, *Cell Technology for Cell Products*, páginas 221-224, R. Smith, Editor; Springer Países Bajos, 2007). Por ejemplo, en ciertas formas de realización de la presente divulgación, el medio sin suero puede utilizar albúmina y/o transferrina, que se ha mostrado que es útil para el crecimiento y expansión de células CD34+ en medio sin suero. Además, se pueden incluir citoquinas, tal como ligando Flt-3, factor de célula madre (SCF), y trombopoyetina (TPO), entre otras. Las CMH también se pueden hacer crecer en recipientes tal como biorreactores (véase, por ejemplo, Liu *et al.*, *Journal of Biotechnology* 124:592-601, 2006). Un medio adecuado para la expansión *ex vivo* de CMH también puede comprender células de apoyo a CMH, tal como células estromales (por ejemplo, células estromales linforreticulares), que pueden derivar, por ejemplo, de la disgregación de tejido linfoides, y que se ha mostrado que soporta el mantenimiento, crecimiento y diferenciación *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de HSC, así como su progenie.

El crecimiento o expansión de CMH se puede medir *in vitro* o *in vivo* según métodos rutinarios conocidos en la técnica. Por ejemplo, el documento WO 2008/073748 describe métodos para medir la expansión *in vivo* e *in vitro* de CMH, y para distinguir entre el crecimiento/expansión de CMH y el crecimiento/expansión de otras células en una población potencialmente heterogénea (por ejemplo, médula ósea), tal como células progenitoras intermedias. El paso de administración o incubación que produce el crecimiento o expansión se puede producir *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, aunque en ciertas formas de realización de la presente divulgación, la administración o incubación se produce durante el tratamiento *ex vivo* de CMH.

El crecimiento o proliferación de células progenitoras de megacariocitos (por ejemplo, tempranas, intermedias, tardías, etc.) también se puede medir según métodos rutinarios conocidos en la técnica y descritos en el presente documento (véase, por ejemplo, el ejemplo 10). Por ejemplo, entre otras características los progenitores de megacariocitos tempranos se pueden identificar por inmunotinción como Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>, y los progenitores de megacariocitos más tardíos se pueden identificar como Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup> (véase, por ejemplo, Perez *et al.*, *PLoS ONE*. 3:e3565, 2008; y Lefebvre *et al.*, *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*. 9:913-921, 2000).

“Sangre de cordón” o “sangre de cordón umbilical” se refiere en general a la cantidad relativamente pequeña de sangre (hasta aproximadamente 180 ml) de un bebé recién nacido que regresa a la circulación neonatal si el cordón umbilical no se pinza prematuramente. La sangre de cordón umbilical es rica en CMH, y se puede recoger y almacenar para uso posterior según métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes en EE UU No. 7.147.626 y 7.131.958). Además, si el cordón umbilical no se pinza finalmente, se produce un pinzamiento fisiológico tras la interacción con aire frío, en donde la sustancia gelatinosa interna, llamada gelatina de Wharton, se hincha alrededor de la arteria y venas umbilicales. No obstante, la gelatina de Wharton puede aún servir como una fuente de CMH.

Como se ha indicado anteriormente, “*ex vivo*” se refiere en general a actividades que tienen lugar fuera de un organismo, tal como experimentación o medida hechos en o sobre tejido vivo en un medio artificial fuera del organismo, preferiblemente con mínima alteración de las condiciones naturales. Lo más comúnmente, los procedimientos “*ex vivo*” implican células o tejidos vivos tomados de un organismo y cultivados en un aparato de laboratorio, habitualmente en condiciones estériles, y típicamente durante unas pocas horas o hasta aproximadamente 24 horas, pero incluyendo hasta 48 o 72 horas, dependiendo de las circunstancias. En ciertas formas de realización de la presente divulgación, tales tejidos o células se pueden recoger y congelar, y después descongelar para tratamiento *ex vivo*. Los experimentos o procedimientos de cultivo de tejido que duran más de unos pocos días usando células o tejido vivos típicamente se consideran que son “*in vitro*”, aunque en ciertas formas de realización de la presente divulgación, este término se puede usar de forma intercambiable con *ex vivo*.

Los términos “administración *ex vivo*”, “tratamiento *ex vivo*” o “uso terapéutico *ex vivo*”, en general se refieren a procedimientos médicos en los que uno o más órganos, células o tejidos se obtienen de un sujeto vivo o recientemente fallecido, opcionalmente purificados/enriquecidos, expuestos a un tratamiento o procedimiento para expandir las células madre (por ejemplo, un paso de administración *ex vivo* que implica incubar las células con una composición de la presente divulgación para aumentar la expansión de células deseables, tal como CMH o progenitores de megacariocitos), y después administrados al mismo o diferente sujeto vivo después de ese tratamiento o procedimiento opcional. Como un ejemplo, la trombocitopenia se puede aliviar por infusión de células progenitoras de megacariocitos (véase, por ejemplo, De Bruyn *et al.*, *Stem Cells Dev*. 14:415-24, 2005).

En el presente documento se divulgan además tales aplicaciones terapéuticas *ex vivo* que también pueden incluir un paso de tratamiento o procedimiento *in vivo* opcional, tal como administrando un polipéptido YRS de la presente divulgación una o más veces al sujeto vivo antes de, durante o después de la administración del órgano, células o tejido. Se contemplan tanto administración local como sistémica para estas formas de realización de la presente divulgación, según métodos bien conocidos en la técnica. La cantidad de polipéptido YRS administrado a un sujeto dependerá de las características de ese sujeto, tal como salud general, edad, sexo, peso corporal, y tolerancia a fármacos, así como el grado, gravedad y tipo de reacción al polipéptido y/o trasplante de células.

### **Estimulación de células que expresan CXCR-2**

Ciertas formas de realización de la presente divulgación se refieren al descubrimiento de los polipéptidos YRS son capaces de estimular la migración de células que expresan CXCR-2. CXCR-2 es un miembro de la familia de receptores de quimioquinas CXC, expresado en una amplia variedad de tipos celulares, incluyen neutrófilos y otras células inmunitarias. Los receptores de quimioquinas CXC son proteínas integrales de membrana que específicamente se unen y responden a citoquinas de la familia de quimioquinas CXC. Estos receptores basados en CXC representan una subfamilia de receptores de quimioquinas, una gran familia de receptores unidos a proteínas G, también denominados receptores de siete transmembranas. Actualmente hay siete receptores de quimioquinas CXC conocidos en mamíferos, nombrados CXCR1 a CXCR7. CXCR-2 (y el muy relacionado CXCR-1) es un receptor bien conocido que reconoce quimioquinas C-X-C que poseen un motivo de aminoácidos E-L-R inmediatamente adyacente a su motivo C-X-C. CXCL8 (es decir, interleuquina-8) y CXCL6 se pueden unir ambos a CXCR1 en humanos, mientras que todas las otras quimioquinas positivas para el motivo ELR, tal como CXCL1 a

CXCL7, se unen solo a CXCR2 (véase, por ejemplo, Tsai *et al.*, *Cell* 110:373-383, 2002; y Pelus *et al.*, *Exp Hematol.* 34:1010-20, 2006). Como se ha indicado anteriormente, CXCR-2 se expresa en la superficie de neutrófilos, y puede desempeñar un papel en la migración de neutrófilos (véase, por ejemplo, Rios-Santos *et al.*, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175:490-497, 2007).

Según esto, dado el papel de CXCR-2 en señalización celular y migración celular (por ejemplo, señalización/migración de neutrófilos), entre otras rutas biológicamente relevantes, ciertas formas de realización de la presente divulgación incluyen métodos de estimular la migración de una célula que expresa CXCR-2, que comprende poner en contacto la célula con un polipéptido tirosil-ARNt sintética, estimulando de esta manera la migración de la célula que expresa CXCR-2.

### **Enfermedades pulmonares y métodos de uso**

Formas de realización de la presente invención también se refieren al descubrimiento inesperado de que los polipéptidos YRS pueden proporcionar beneficios en el tratamiento de enfermedades pulmonares, tal como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). A este respecto, la migración de neutrófilos desde el sistema circulatorio a los pulmones está implicada en enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (véase, por ejemplo, R.A. Stockley, *Chest* 121:151S-155S, 2002). Como se ha indicado anteriormente, CXCR-2 se expresa en la superficie de neutrófilos, y puede desempeñar un papel en la migración de neutrófilos (véase, por ejemplo, Rios-Santos *et al.*, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175:490-497, 2007). Puesto que la señalización de CXCR-2 en neutrófilos está implicada en su migración a ciertos tejidos, tal como los pulmones, especialmente en respuesta a materia exógena, tal como irritantes, bacterias, lipopolisacárido (LPS), etc., puede estar implicado, por tanto, en varios estados patológicos, tal como EPOC.

Dadas las observaciones de que los polipéptidos YRS de la presente divulgación afectan la señalización de CXCR-2 y la migración de células polimorfonucleares (PMN) (véase, por ejemplo, los ejemplos 7 y 8), se cree que estos polipéptidos pueden ser útiles en el tratamiento o control de enfermedades pulmonares, tal como EPOC. Por ejemplo, sin querer estar unido por ninguna teoría, los polipéptidos YRS se pueden usar para desensibilizar neutrófilos circulatorios a varios irritantes o alérgenos, reduciendo de esta manera la migración de estas células inmunitarias a los pulmones (véase, por ejemplo, el ejemplo 9). Por tanto, ciertas formas de realización de la presente divulgación se refieren a métodos para tratar o controlar (por ejemplo, reducir las complicaciones de) inflamación pulmonar y/o enfermedades pulmonares, tal como EPOC, que comprenden administrar a un sujeto con inflamación pulmonar o EPOC una concentración eficaz de un polipéptido tirosil-ARNt sintética, reduciendo de esta manera EPOC y/o sus síntomas, en el sujeto. Con frecuencia, al desensibilizar células inmunitarias, se requieren múltiples administraciones (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.), típicamente a una frecuencia definida (número de administraciones al día, a la semana, al mes, etc.).

EPOC se refiere en general a un grupo de enfermedades pulmonares que bloquean el flujo de aire y hacen crecientemente difícil para individuos afectados respirar normalmente. Enfisema y bronquitis crónica con las dos afecciones principales en el grupo de las enfermedades EPOC, pero EPOC también puede referirse a daño causado por bronquitis asmática crónica, entre otras afecciones conocidas en la técnica. En todos los casos, el daño a las vías respiratorias finalmente interfiere con el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono en los pulmones. El tratamiento se enfoca principalmente en controlar los síntomas y minimizar daño adicional.

El enfisema representa un aspecto de la EPOC. El enfisema produce inflamación en las paredes frágiles de los alveolos, que pueden destruir algunas de las paredes y fibras elásticas, lo que permite que vías respiratorias pequeñas se colapsen al exhalar, y deterioran el flujo de aire a los pulmones. Los signos y síntomas del enfisema incluyen, por ejemplo, dificultad para respirar, especialmente durante actividades físicas, sibilancias, y opresión en el pecho.

La bronquitis crónica representa otro aspecto de la EPOC. La bronquitis crónica se caracteriza por una tos continua, y produce inflamación y estrechamiento de los tubos bronquiales. Esta afección también produce producción de moco aumentada, que puede además bloquear los tubos estrechados. La bronquitis crónica se produce principalmente en fumadores, y típicamente se define como tos que dura durante al menos tres meses a un año durante dos años consecutivos. Los signos y síntomas de la bronquitis crónica incluyen, por ejemplo, tener que aclararse la garganta lo primero por la mañana, especialmente para fumadores, una tos crónica que produce esputo amarillento, dificultad para respirar en las fases posteriores, e infecciones respiratorias frecuentes.

Como se ha indicado anteriormente, EPOC se refiere principalmente a obstrucción en los pulmones resultante de las dos afecciones pulmonares crónicas indicadas anteriormente. Sin embargo, muchos individuos con EPOC tienen ambas de estas afecciones.

La bronquitis asmática crónica representa otro aspecto de EPOC. La bronquitis asmática crónica habitualmente se caracteriza como bronquitis crónica combinada con asma (broncoespasmo). El asma se puede producir cuando secreciones inflamadas e infectadas irritan los músculos lisos en las vías respiratorias. Los síntomas son similares a los de la bronquitis crónica, pero también incluyen episodios intermitentes, o incluso diarios de sibilancias.

Principalmente, la EPOC está finalmente causada por el humo de cigarrillos y otros irritantes. En la gran mayoría de los casos, el daño pulmonar que produce EPOC está causado por fumar cigarrillos a largo plazo. Sin embargo, otros irritantes pueden causar EPOC, incluyendo, humo de puro, humo secundario, humo de pipa, contaminación del aire y ciertos vapores ocupacionales. La enfermedad de reflujo gastroesofágico (ERGE), que se produce cuando los ácidos del estómago vuelven hacia arriba en el esófago, puede no solo agravar la EPOC, sino que incluso puede causarla en algunos individuos. En casos raros, la EPOC resulta de un trastorno genético que produce bajos niveles de una proteína llamada alfa-1-antitripsina. Por tanto, los factores de riesgo para EPOC incluyen exposición a humo de tabaco, exposición ocupacional a polvos y sustancias químicas (la exposición a largo plazo a vahos, vapores y polvos químicos irrita e inflama los pulmones), enfermedad de reflujo gastroesofágico (una forma grave de reflujo ácido – el reflujo de ácido y otros contenidos del estómago en el esófago), edad (la EPOC se desarrolla lentamente durante años, de modo que la mayoría de las personas tienen al menos 40 años de edad cuando los síntomas empiezan), y genética (un raro trastorno genético conocido como deficiencia en alfa-1-antitripsina es la fuente de unos pocos casos de EPOC).

Las complicaciones de EPOC pueden incluir infecciones respiratorias, alta presión sanguínea, problemas de corazón (por ejemplo, ataques al corazón), cáncer de pulmón (los fumadores con bronquitis crónica tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón que lo fumadores que no tienen bronquitis crónica), y depresión, entre otros conocidos en la técnica.

Los sujetos con EPOC se pueden identificar según métodos diagnósticos rutinarios conocidos en la técnica. Por ejemplo, pruebas de función pulmonar, tal como espirometría, miden cuando aire pueden mantener los pulmones y cómo de rápido un individuo puede expulsar el aire de sus pulmones. La espirometría puede detectar EPOC antes de la aparición de los síntomas, y también se puede usar para seguir la evolución de la enfermedad y seguir el tratamiento. Además, los rayos X del pecho muestran enfisema, una de las causas principales de EPOC, y también pueden descartar otros problemas pulmonares o insuficiencia cardíaca. Además, el análisis de gas de la sangre arterial mide cómo de eficazmente los pulmones llevan el oxígeno a la sangre y eliminan el dióxido de carbono, proporcionando una indicación de EPOC. El examen de esputo, es decir, el análisis de las células en el esputo, puede identificar la causa de ciertos problemas pulmonares y ayuda a descartar ciertos cánceres pulmonares. Además, la tomografía computarizada (TAC) produce imágenes muy detalladas de los órganos internos, lo que puede ayudar a detectar enfisema y, por tanto, EPOC.

Como se divulga en otro lugar en el presente documento, la cantidad de polipéptido YRS administrada a un sujeto con EPOC (o en riesgo para EPOC) dependerá de las características de ese sujeto, tal como la salud general, edad, sexo, peso corporal, y tolerancia a fármacos, así como el grado, gravedad, y tipo de reacción al polipéptido.

#### **Formulaciones y composiciones farmacéuticas**

Las composiciones de la presente divulgación comprenden polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa, incluyendo truncamientos y/o variantes de los mismos, formulados en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables para la administración a una célula o un animal, sea solas, o en combinación con una o más modalidades de terapia. También se entenderá que, si se desea, las composiciones de la presente divulgación se pueden administrar en combinación con otros agentes también, tal como, por ejemplo, otras proteínas o polipéptidos o varios agentes farmacéuticamente activos. Virtualmente no hay límite a otros componentes que se pueden incluir también en las composiciones de la presente divulgación, siempre que los agentes adicionales no afecten adversamente los efectos trombotopoyéticos u otros deseados que se van a alcanzar.

En las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación, la formulación de excipientes y soluciones soporte farmacéuticamente aceptables la conocen bien los expertos en la materia, como lo es el desarrollo de pautas de dosificación y tratamiento adecuadas para usar las composiciones particulares descritas en el presente documento en una variedad de pautas de tratamiento, incluyendo, por ejemplo, administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal e intramuscular.

En ciertas aplicaciones, las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento se pueden administrar mediante administración oral a un sujeto. Como tal, estas composiciones se pueden formular con un diluyente inerte o con un soporte comestible asimilable, o pueden estar incluidas en una cápsula de gelatina de caparazón duro o blando, o se pueden comprimir a comprimidos, o se pueden incorporar directamente con la comida de la dieta.

En ciertas circunstancias será deseable administrar las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento por vía parenteral, intravenosa, intramuscular o incluso intraperitoneal como se describe, por ejemplo, en la patente en EE UU No. 5.543.158; la patente en EE UU No. 5.641.515 y la patente en EE UU No. 5.399.363. Se pueden preparar soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de mismos y en aceites. En condiciones normales de

almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

5 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (patente en EE UU No. 5.466.468). En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado que exista fácil jeringabilidad. Debe ser estable en condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos, tal como bacterias y hongos. El soporte puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede facilitar por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede producir mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

20 Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución se debe tamponar adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido primero se hace isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En relación a esto, los expertos en la materia conocerán un medio acuoso estéril que se pueda emplear a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosis se puede disolver en 1 ml de solución de NaCl isotónica y bien añadir a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectar en el sitio propuesto de infusión (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 15ª Edición, pp. 1035-1038 y 25 1570-1580). Se producirá necesariamente alguna variación en la dosis dependiendo del estado del sujeto que se trata. La persona responsable para la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para la administración humana, las preparaciones deben cumplir los estándares de esterilidad, pirogenicidad, y seguridad y pureza generales, requeridos por la Oficina de la FDA de estándares biológicos.

35 Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el solvente apropiado con los otros varios ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los varios principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que dan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

40 Las composiciones divulgadas en el presente documento se pueden formular en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácida (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tal como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o tales ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas tal como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o 45 férrico, y tales bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación farmacéutica y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas tal como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos, y similares.

50 Como se usa en el presente documento, "soporte" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, tampones, soluciones soporte, suspensiones, coloides, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar ingredientes activos suplementarios en las composiciones.

60 La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administran a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como principio activo se entiende bien en la técnica. Típicamente, tales composiciones se preparan como inyectables bien como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar.

65 En ciertas formas de realización de la presente divulgación, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por espráis intranasales, inhalación y/u otros vehículos de administración de aerosoles. Los métodos para

administrar composiciones de genes, polinucleótidos, y péptidos directamente a los pulmones a través de espráis de aerosoles nasales se han descrito, por ejemplo, en la patente en EE UU No. 5.756.353 y la patente en EE UU No. 5.804.212. Asimismo, la administración de fármacos usando resinas de micropartículas intranasales (Takenaga et al., 1998) y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (patente en EE UU No. 5.725.871) también son bien conocidos en las artes farmacéuticas. Asimismo, la administración de fármacos transmucosa en forma de una matriz soporte de politetrafluoroetileno se describe en la patente en EE UU No. 5.780.045.

En ciertas formas de realización divulgadas en el presente documento, la administración se puede producir mediante el uso de liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas, y similares, para la introducción de las composiciones de la presente divulgación en células huésped adecuadas. En particular, las composiciones de la presente divulgación se pueden formular para la administración bien encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, un nanopartícula o similares. Las formulaciones y uso de tales vehículos de administración se pueden llevar a cabo usando técnicas conocidas y convencionales.

## 15 Ejemplos

### Ejemplo 1

#### 20 Estimulación de trombopoyesis *in vivo*

Se midieron los efectos de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa sobre trombopoyesis *in vivo*. El polipéptido tirosil-ARNt sintetasa utilizado en los experimentos descritos a continuación es un truncamiento C-terminal que comprende los aminoácidos 1-364 de la tirosil-ARNt sintetasa humana. Este polipéptido C-terminalmente truncado se fusionó a una etiqueta C-terminal de ocho aminoácidos (365-L-E-H-H-H-H-H-372) (SEQ ID NO: 5). La secuencia de aminoácidos de la tirosil-ARNt sintetasa de longitud completa se muestra en SEQ ID NO: 1.

Para medir los efectos de polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa en trombopoyesis, en un primer conjunto de experimentos, se inyectaron ratones por vía subcutánea dos veces al día durante siete días con 3 µg/kg del polipéptido tirosil-ARNt sintetasa C-terminalmente truncado. En un segundo conjunto de experimentos, se inyectaron ratones dos veces al día durante siete días con 1, 3, y 10 µg/kg del polipéptido tirosil-ARNt sintetasa C-terminalmente truncado. En un tercer conjunto de experimentos, se inyectaron ratones por vía subcutánea dos veces al día durante seis días con (i) 3 y 300 µg/kg del polipéptido tirosil-ARNt sintetasa C-terminalmente truncado, y una inyección diaria única de (ii) 90 µg/kg de trombopoyetina (TPO), y (iii) G-CSF 250 µg/kg.

Para el primer y segundo conjunto de experimentos descritos anteriormente, el recuento de plaquetas de cada animal se determinó tras completar el protocolo de administración. Para el tercer conjunto de experimentos, se examinaron la histología de la médula ósea y el bazo al final del protocolo de administración.

La administración de tirosil-ARNt sintetasa truncada durante aproximadamente una semana mostró un aumento *in vivo*, reproducible en actividad trombopoyética, medida bien por recuento de plaquetas aumentado o número de megacariocitos aumentado. La figura 5(a) muestra el recuento de plaquetas para el experimento en que los ratones se inyectaron con 1, 3 y 10 µg/kg del polipéptido tirosil-ARNt sintetasa truncado, comparado con un control de solución salina tamponada con fosfato (PBS). La figura 5(b) muestra el recuento de plaquetas para el experimento en que los ratones se inyectaron con 3 µg/kg del polipéptido tirosil-ARNt sintetasa truncado, comparado con un control de PBS. En ambos experimentos, los ratones mostraron un aumento en los recuentos de plaquetas sobre el control en respuesta al tratamiento con un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa como se divulga en el presente documento. La figura 6 muestra un aumento en los números de megacariocitos en respuesta a la administración del polipéptido tirosil-ARNt sintetasa truncado, comparado con animales sin tratar, que es comparable a los números aumentados observados después de la administración de TPO. Estos resultados muestran que fragmentos de polipéptido tirosil-ARNt sintetasa, y en particular fragmentos C-terminalmente truncados, son capaces de estimular trombopoyesis *in vivo*.

### Ejemplo 2

#### 55 Medidas de trombopoyesis *in vitro*

Los efectos sobre la trombopoyesis también se pueden medir *in vitro*. Se tratan células madre *in vitro* con un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa de la presente divulgación para determinar su efecto sobre progenitores hematopoyéticos de los linajes eritroide, mieloide y megacariocítico usando ensayos de células formadoras de colonias (CFC) (por ejemplo, inhibición, estimulación, toxicidad, sinergia con otras citoquinas, defectos hematopoyéticos). Además, se tratan células progenitoras de megacariocitos CD34+ *in vitro* con un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa de la presente divulgación para seguir la expansión y diferenciación de megacariocitos (por ejemplo, aumento en el número de células progenitoras, estimulación de diferenciación, aumento en poliploidía). Se realizan experimentos similares usando células de médula ósea y bazo derivadas de ratones tratados con un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa.

## Ejemplo 3

La terapia de combinación estimula trombopoyesis

5 Para evaluar si un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa de la presente divulgación tiene un efecto sinérgico y/o aditivo en la proliferación y diferenciación de megacariocitos *in vitro*, células de sangre de cordón umbilical CD34+ se hacen crecer en medio de cultivo líquido en presencia de formulaciones óptimas o subóptimas de citoquinas (StemCell Technologies, Vancouver), tal como IL-11, y se tratan con un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa. Se puede determinar la aditividad o sinergia siguiendo el crecimiento y diferenciación de las células progenitoras en las dos condiciones de formulación.

15 De forma similar, en un protocolo comparable al que se describe en el ejemplo 1, se inyectaron ratones con una cantidad limitante de trombopoyetina y con cantidades crecientes de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa y los efectos de la terapia de combinación sobre trombopoyesis *in vivo* se pueden determinar por recuentos de plaquetas y megacariocitos. Además, la terapia de combinación con cantidades limitadas de otras citoquinas, quimioquinas y/o factores de crecimiento implicados en hematopoyesis se puede evaluar usando el mismo tipo de pauta.

## Ejemplo 4

20 Actividad trombopoyética de polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa en ratas

25 Se midieron los efectos de dos polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa sobre trombopoyesis en ratas. Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa utilizados en los experimentos descritos a continuación son: i) un truncamiento C-terminal que comprende los aminoácidos 1-364 de la tirosil-ARNt sintetasa humana de longitud completa (SEQ ID NO: 3) fusionada a una etiqueta de histidina C-terminal de ocho aminoácidos (SEQ ID NO: 5) y ii) un mutante de la tirosil-ARNt sintetasa humana de longitud completa con una única sustitución de aminoácidos, tirosina a alanina, en la posición 341, denominada "Y341A" (SEQ ID NO: 2).

30 Para medir los efectos de los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa sobre trombopoyesis, se determinó el recuento de plaquetas para cada rata el día antes de la primera inyección programada y los animales se agruparon en siete cohortes según recuentos iniciales de plaquetas. Se inyectaron tres grupos de ratas por vía intravenosa una vez al día durante siete días con 0,1, 10 y 1000 µg/kg del polipéptido tirosil-ARNt sintetasa C-terminalmente truncado, respectivamente. Se administraron las mismas dosis de Y341A a tres grupos adicionales. Un grupo control recibió una inyección diaria de tampón solo (PBS 0,5X, DTT 2 mM) y un grupo control adicional se inyectó a diario con 90 µg/kg de trombopoyetina (R&D Systems, Minneapolis, MN).

40 La administración de dos polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa produjo una subida marcada en los recuentos de plaquetas, comparable o superior a la observada en el grupo de trombopoyetina (véase la figura 20). Estos resultados muestran que los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa son capaces de estimular trombopoyesis *in vivo*.

## Ejemplo 5

Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa son quimioatrayentes para megacariocitos

45 Se cultivaron células MO7e (DSMZ, Braunschweig, Alemania) en medio RPMI-1640 suplementado con SBF inactivado por calor al 20% e IL-3 10 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, MN). Las células se mantuvieron a una densidad de  $2 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$ /ml y se usó medio RPMI-1640 con BSA al 0,1% como tampón de migración. Antes del ensayo de migración, las células se ayunaron de suero durante 30 minutos en tampón de migración y se cargaron con calceína AM 8 µg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos sin freno y se lavaron una vez con tampón de migración para eliminar calceína AM libre. Se ajustó la densidad celular a  $1 \times 10^7$ /ml y se añadieron 100 µl a insertos de filtro de poro de 8,0 µm de transwell de 6,5 mm (Costar, Cambridge, MA). Se añadieron 600 µl de tampón de migración que contenía PBS, una quimioquina control o los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa a la cámara inferior y las células se dejaron migrar durante 4 a 16 horas (para el tiempo de migración de 16 horas, las células se tiñeron después de la migración). Las células que migraron a la cámara inferior se recogieron y resuspendieron en 100 µl de PBS, se transfirieron a una placa de Greiner opaca de 384 pocillos y se contaron por fluorescencia en un lector de placas. La figura 21 muestra que los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa estimulan la migración de los megacarioblastos MO7e.

## Ejemplo 6

60 Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa fomentan la adhesión celular a monocapas endoteliales estimulando la expresión de VCAM-1

65 Se probó la capacidad de polipéptidos YRS para estimular la adhesión de células THP-1 a monocapas endoteliales de células HUVEC-2. Las células HUVEC-2 (BD Biosciences, San Jose, CA) se cultivaron en medio EGM-2 (Lonza, Allendale, NJ) y se usaron antes de que alcanzaran 10 pases. Las células THP-1 (ATCC, Manassas, VA) se

cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con SBF inactivado por calor al 10% y se mantuvieron a una densidad de  $2-4 \times 10^5$ /ml. Las células se sembraron a aproximadamente  $1 \times 10^4$  células/pocillo en placas de 96 pocillos opacas recubiertas con fibronectina (10  $\mu$ g/ml, 2 horas a 37°C).

5 Las células HUVEC-2 se hicieron crecer hasta que se formó una monocapa y después se estimularon durante la noche en medio EGM-2 con PBS, IL-1 $\beta$  o los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa. Las células THP-1 se recogieron e incubaron durante 30 minutos en medio RPMI-1640 sin suero que contenía BSA al 0,1% y calceína AM (6  $\mu$ l/ml). Las células se lavaron después en medio RPMI-1640 sin suero que contenía BSA al 0,1% y se resuspendieron a una densidad de  $1,5 \times 10^5$  células/ml en medio RPMI que contenía SBF al 10%. Se añadieron 100  $\mu$ l de células THP a la monocapa de HUVEC y se incubó durante 15 minutos. Las células THP-1 sin unir se lavaron con PBS dos veces y las células restantes se fijaron con formaldehído al 2% y se contaron por fluorescencia en un lector de placas.

15 La figura 22 muestra la adhesión de las células fluorescentes THP-1 a una monocapa endotelial que se ha tratado con los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa.

Se midió la expresión de molécula de adhesión en monocapas endoteliales después de la exposición a polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa. Se sembraron  $1 \times 10^4$  células HUVEC-2 en una placa de 96 pocillos y se hicieron crecer durante 48 horas como se describe en el párrafo previo. Se añadieron polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa, diluidos en medio de crecimiento, a los pocillos y se incubó durante 16 horas. El medio de cultivo se retiró y las células se fijaron con 50  $\mu$ l de Z fix (Anatech Ltd, Battle Creek, MI) durante 25 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se bloquearon posteriormente con 50  $\mu$ l de caseína durante 1 hora seguido por múltiples lavados de 200  $\mu$ l con PBS. Todos los reactivos posteriores se diluyeron en caseína y todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente. Se añadieron anticuerpos dirigidos contra VCAM-1 y E-selectina (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) durante 1 hora. Los pocillos se lavaron después como anteriormente y se añadió un anticuerpo secundario marcado con HRP (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) durante 1 hora. Los pocillos se lavaron y se añadió el sustrato para HRP. 15 minutos después, se añadió un volumen igual de ácido sulfúrico 2 M y se determinó la absorbancia a 450 nm.

30 La figura 23 muestra un aumento en la expresión de VCAM-1 después de la estimulación de las células endoteliales con los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa.

#### Ejemplo 7

35 Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa estimulan la migración de líneas de células 293 y CHO transfectadas con el receptor CXCR-2

Se probaron los efectos de polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa en la señalización de CXCR-2 midiendo la migración de células que expresan CXCR-2 en respuesta a dichos polipéptidos. Las células 293/CXCR-2 se mantuvieron en medio DMEM suplementado con SBF inactivado por calor al 10%, penicilina-estreptomina al 1% y geneticina 800  $\mu$ g/ml, todos comprados de Invitrogen, Carlsbad, CA. Se usó medio DMEM con BSA al 0,1% como tampón de migración. Antes del ensayo de migración, las células se ayunaron de suero durante 30 minutos en tampón de migración, se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos y se resuspendieron en tampón de migración a una densidad final de  $1 \times 10^6$  células/ml. Se añadieron 100  $\mu$ l a insertos de filtro de transwell de 6,5 mm (Costar, Cambridge, MA) y se añadieron 600  $\mu$ l de tampón de migración que contenía una quimioquina control, los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa o tampón solo a las cámaras inferiores de la placa. Las células se dejaron migrar durante 4 horas y las células restantes en la cámara superior (insertos de filtro transwell) se retiraron con un bastoncillo de algodón. Los insertos de filtro se transfirieron después a una nueva placa de 24 pocillos que contenía 500  $\mu$ l de tampón de disociación celular (Invitrogen, Carlsbad, CA) y calceína AM 12  $\mu$ g/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA). Después de 1 hora de incubación a 37°C, las células se recogieron y resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS, se transfirieron a una placa opaca de Greiner de 384 pocillos y se contaron por fluorescencia en un lector de placas.

Las células CHO-K1-CXCR-2 se mantuvieron en medio F12 suplementado con SBF inactivado por calor al 10%, penicilina-estreptomina al 1% y geneticina 800  $\mu$ g/ml. Se usó medio F12 con BSA al 0,5% como tampón de migración. Antes del ensayo de migración, las células se ayunaron de suero durante 30 minutos en tampón de migración, se recogieron usando tampón de disociación celular, se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos y se resuspendieron en tampón de migración a una densidad final de  $1 \times 10^6$  células/ml. Se añadieron 100  $\mu$ l a insertos de filtro de transwell de 6,5 mm y se añadieron 600  $\mu$ l de tampón de migración que contenía una quimioquina control, los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa o tampón solo a las cámaras inferiores de la placa. Las células se dejaron migrar durante 3 horas y las células restantes en la cámara superior (insertos de filtro transwell) se retiraron con un bastoncillo de algodón. Los insertos de filtro se transfirieron después a una nueva placa de 24 pocillos que contenía 500  $\mu$ l de PBS y calceína AM 12  $\mu$ g/ml. Después de 30 minutos de incubación a 37°C, los filtros se transfirieron otra vez a una placa de 24 pocillos nueva que contenía 500  $\mu$ l de tripsina sin rojo fenol. Después de 2 a 5 minutos de incubación, las células separadas se recogieron y resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS, se transfirieron a una placa opaca de Greiner de 384 pocillos y se contaron por fluorescencia en un lector de placas.

65

La figura 24 demuestra la capacidad de los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa para inducir migración de células transfectadas con CXCR-2.

#### Ejemplo 8

Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa estimulan la migración de células polimorfonucleares (PMN)

Para probar los efectos de los polipéptidos YRS sobre la migración de células PMN, se purificaron células granulocíticas humanas de sangre periférica humana reciente usando el kit de enriquecimiento de granulocitos humanos RosetteSep® (StemCell Technologies, Vancouver, BC) según las instrucciones del fabricante. Se usó medio RPMI sin suero suplementado con SBF al 0,5% como tampón de migración. Se resuspendieron  $4 \times 10^7$  células en 1 ml de tampón de migración y se incubaron durante 30 minutos con 8  $\mu$ l de una solución de calceína AM 1 mg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se recogieron, se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos sin freno, se lavaron una vez con tampón de migración y se resuspendieron en el mismo tampón a una densidad de  $1 \times 10^7$ /ml.

Se añadieron 100  $\mu$ l a insertos de filtro de transwell de 6,5 mm (Costar, Cambridge, MA) y se añadieron 600  $\mu$ l de tampón de migración que contenía una quimioquina control, los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa o tampón solo a las cámaras inferiores de la placa. Las células se dejaron migrar durante 45 minutos en el incubador y las células que migraron a la cámara inferior se recogieron, resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS, se transfirieron a una placa de Greiner opaca de 384 pocillos y se contaron por fluorescencia en un lector de placas.

La figura 25 muestra la curva de migración en forma de campana típicamente observada con quimioquinas. Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa indujeron una migración bifásica de PMN tanto a concentraciones pM bajas como  $\mu$ M mayores.

#### Ejemplo 9

Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa previenen la infiltración de neutrófilos en los pulmones después de exposición a lipopolisacárido (LPS) (ejemplo profético)

La migración de neutrófilos del sistema circulatorio a los pulmones está implicada en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (véase, por ejemplo, R.A. Stockley, *Chest* 121:151S-155S, 2002). La expresión de CXCR-2 puede desempeñar un papel en la migración de neutrófilos (véase, por ejemplo, Rios-Santos *et al.*, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175:490-497, 2007). Se desarrolla un modelo animal para probar el papel de los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa en EPOC. Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa se administran a los animales por vía intravenosa a una concentración y a una frecuencia necesarias para alcanzar desensibilización de neutrófilos circulantes antes de, y durante la exposición al alérgeno (por ejemplo, entre 100 ng/kg y 5 mg/kg y, por ejemplo, 12 horas, 1 hora antes de la administración de LPS y 4 horas después de la administración de LPS). Los animales se someten después a exposición a alérgeno (por ejemplo, instilación de LPS en los pulmones a través de la vía intranasal de administración). Después de 4-8 horas, los animales se sacrifican y se inserta un catéter traqueal para recoger muestras de lavado bronquioalveolar (LBA) enjuagando los pulmones con solución salina isotónica. El fluido de LBA se analiza para recuentos de células totales y enumeración de células diferencial.

En este ejemplo, los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa son capaces de prevenir la migración de neutrófilos al pulmón en respuesta a la exposición de LPS.

#### Ejemplo 10

Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa impactan en células progenitoras de megacariocitos en cultivos de células de médula ósea

Para probar los efectos de polipéptidos YRS en células progenitoras de megacariocitos en cultivos de células de médula ósea, se evaluaron los progenitores clonogénicos del linaje de megacariocitos (UFC-Mk; unidad formadora de colonia – megacariocito) en medio basado en colágeno, sin suero MegaCult-C® 4950 suplementado con concentraciones propietarias de citoquinas (StemCell Technologies, Vancouver, BC). Se almacenaron células de médula ósea humana normal de baja densidad (Lonza, Allendale, NJ) a  $-152^{\circ}\text{C}$  hasta que se requirieran para el ensayo. El día del experimento, las células se descongelaron rápidamente a  $37^{\circ}\text{C}$ , el contenido del vial se diluyó en 10 ml de medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) que contenía suero bovino fetal (SBF) al 2% y se lavaron por centrifugación (1200 rpm durante 10 minutos, temperatura ambiente). El sobrenadante se desechó y el precipitado celular se resuspendió en un volumen conocido de IMDM que contenía SBF al 2%. Se realizaron un recuento celular (ácido acético glacial al 3%) y evaluación de viabilidad (prueba de exclusión de azul de tripán).

Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa (almacenados en glicerol al 50%/PBS 0,5X/DTT 2 mM) se dializaron en PBS 0,5X/DTT 2 mM durante un total de 5 horas, con un cambio de tampón después de 3 horas para eliminar glicerol.

Después de la diálisis, las proteínas y tampón de muestra se esterilizaron por filtración y la concentración se ajustó para compensar por el aumento en volumen.

5 Se añadieron las proteínas de prueba (polipéptidos YRS) a tubos de medio basado en colágeno, sin suero MegaCult-C® 4950 suplementado con citoquinas (rhTpo, rhIL-3 y rhIL-6). También se iniciaron cultivos control estándar (que no contenían proteína de prueba) y cultivos control de solvente (que no contenían proteína de prueba sino concentraciones equivalentes de tampón). Se añadieron después células de médula ósea a cada tubo de medio para dar una concentración final de  $1 \times 10^5$  células por portaobjetos. Se añadió después colágeno bovino, los tubos se agitaron en el vortex, y el contenido se dispensó en portaobjetos de cámaras dobles en triplicado. Todos los cultivos se incubaron durante 10-12 días a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%.

15 Después de la incubación, los cultivos se evaluaron microscópicamente para formación de colonias antes de deshidratación y fijación del portaobjetos. Usando un protocolo de tinción con anticuerpos para detectar la expresión de GPIIa/IIIb (CD41), las colonias en los portaobjetos se tiñeron usando un sistema de detección con fosfatasa alcalina como se describe en el manual técnico de StemCell, "Assays for the Quantitation of Human and Murine Megakaryocytic Progenitors", Sección 7. Los números de colonias los puntuaron y evaluaron personal entrenado de StemCell. Las colonias se dividieron en las siguientes categorías, basado en el tamaño y morfología: i) UFC-Mk (2-20) – la colonia megacariocítica pequeña derivada de esta célula progenitora más madura contiene 2-20 células; ii) UFC-Mk – la colonia megacariocítica mediana derivada de esta célula progenitora más primitiva contiene 21-49 células; y iii) UFC-Mk (>50) – la colonia megacariocítica grande derivada de esta célula progenitora de linaje restringido más primitiva contiene >50 células.

25 La figura 26 muestra el impacto de los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa sobre los progenitores de linaje restringido más primitivos (estimulación) (figura 26(A)), y sobre los progenitores más maduros (inhibición) (figuras 26 (A) y (B)).

**Lista de secuencias**

<110> aTyr Pharma Inc.  
Belani, Rajesh  
30 Watkins, Jeffrey Dean  
Zhang, Wei  
Wasserot, Alain Philippe

35 <120> ACTIVIDAD TROMBOPOYÉTICA DE POLIPÉPTIDOS TIROSIL-ARNt SINTETASA

<130> 120161.409PC

<140> PCT  
<141> 10-06-2009

40 <160> 15

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

45 <210> 1  
<211> 528  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

50 <400> 1

ES 2 622 444 T3

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

ES 2 622 444 T3

```

                260                265                270
Ser Glu Phe Val Ile Leu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Gly Asn Lys Thr
      275                280                285
Tyr Thr Ala Tyr Val Asp Leu Glu Lys Asp Phe Ala Ala Glu Val Val
      290                295                300
His Pro Gly Asp Leu Lys Asn Ser Val Glu Val Ala Leu Asn Lys Leu
      305                310                315
Leu Asp Pro Ile Arg Glu Lys Phe Asn Thr Pro Ala Leu Lys Lys Leu
      325                330                335
Ala Ser Ala Ala Tyr Pro Asp Pro Ser Lys Gln Lys Pro Met Ala Lys
      340                345                350
Gly Pro Ala Lys Asn Ser Glu Pro Glu Glu Val Ile Pro Ser Arg Leu
      355                360                365
Asp Ile Arg Val Gly Lys Ile Ile Thr Val Glu Lys His Pro Asp Ala
      370                375                380
Asp Ser Leu Tyr Val Glu Lys Ile Asp Val Gly Glu Ala Glu Pro Arg
      385                390                395
Thr Val Val Ser Gly Leu Val Gln Phe Val Pro Lys Glu Glu Leu Gln
      405                410                415
Asp Arg Leu Val Val Val Leu Cys Asn Leu Lys Pro Gln Lys Met Arg
      420                425                430
Gly Val Glu Ser Gln Gly Met Leu Leu Cys Ala Ser Ile Glu Gly Ile
      435                440                445
Asn Arg Gln Val Glu Pro Leu Asp Pro Pro Ala Gly Ser Ala Pro Gly
      450                455                460
Glu His Val Phe Val Lys Gly Tyr Glu Lys Gly Gln Pro Asp Glu Glu
      465                470                475
Leu Lys Pro Lys Lys Lys Val Phe Glu Lys Leu Gln Ala Asp Phe Lys
      485                490                495
Ile Ser Glu Glu Cys Ile Ala Gln Trp Lys Gln Thr Asn Phe Met Thr
      500                505                510
Lys Leu Gly Ser Ile Ser Cys Lys Ser Leu Lys Gly Gly Asn Ile Ser
      515                520                525

```

<210> 2

<211> 528

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Gly Asp Ala Pro Ser Pro Glu Glu Lys Leu His Leu Ile Thr Arg
  1                5                10                15
Asn Leu Gln Glu Val Leu Gly Glu Glu Lys Leu Lys Glu Ile Leu Lys
  20                25                30
Glu Arg Glu Leu Lys Ile Tyr Trp Gly Thr Ala Thr Thr Gly Lys Pro
  35                40                45
His Val Ala Tyr Phe Val Pro Met Ser Lys Ile Ala Asp Phe Leu Lys
  50                55                60
Ala Gly Cys Glu Val Thr Ile Leu Phe Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu
  65                70                75                80
Asp Asn Met Lys Ala Pro Trp Glu Leu Leu Glu Leu Arg Val Ser Tyr
  85                90                95
Tyr Glu Asn Val Ile Lys Ala Met Leu Glu Ser Ile Gly Val Pro Leu
  100               105               110
Glu Lys Leu Lys Phe Ile Lys Gly Thr Asp Tyr Gln Leu Ser Lys Glu
  115               120               125
Tyr Thr Leu Asp Val Tyr Arg Leu Ser Ser Val Val Thr Gln His Asp
  130               135               140
Ser Lys Lys Ala Gly Ala Glu Val Val Lys Gln Val Glu His Pro Leu
  145               150               155               160

```

ES 2 622 444 T3

Leu Ser Gly Leu Leu Tyr Pro Gly Leu Gln Ala Leu Asp Glu Glu Tyr  
 165 170 175  
 Leu Lys Val Asp Ala Gln Phe Gly Gly Ile Asp Gln Arg Lys Ile Phe  
 180 185 190  
 Thr Phe Ala Glu Lys Tyr Leu Pro Ala Leu Gly Tyr Ser Lys Arg Val  
 195 200 205  
 His Leu Met Asn Pro Met Val Pro Gly Leu Thr Gly Ser Lys Met Ser  
 210 215 220  
 Ser Ser Glu Glu Glu Ser Lys Ile Asp Leu Leu Asp Arg Lys Glu Asp  
 225 230 235 240  
 Val Lys Lys Lys Leu Lys Lys Ala Phe Cys Glu Pro Gly Asn Val Glu  
 245 250 255  
 Asn Asn Gly Val Leu Ser Phe Ile Lys His Val Leu Phe Pro Leu Lys  
 260 265 270  
 Ser Glu Phe Val Ile Leu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Gly Asn Lys Thr  
 275 280 285  
 Tyr Thr Ala Tyr Val Asp Leu Glu Lys Asp Phe Ala Ala Glu Val Val  
 290 295 300  
 His Pro Gly Asp Leu Lys Asn Ser Val Glu Val Ala Leu Asn Lys Leu  
 305 310 315 320  
 Leu Asp Pro Ile Arg Glu Lys Phe Asn Thr Pro Ala Leu Lys Lys Leu  
 325 330 335  
 Ala Ser Ala Ala Ala Pro Asp Pro Ser Lys Gln Lys Pro Met Ala Lys  
 340 345 350  
 Gly Pro Ala Lys Asn Ser Glu Pro Glu Glu Val Ile Pro Ser Arg Leu  
 355 360 365  
 Asp Ile Arg Val Gly Lys Ile Ile Thr Val Glu Lys His Pro Asp Ala  
 370 375 380  
 Asp Ser Leu Tyr Val Glu Lys Ile Asp Val Gly Glu Ala Glu Pro Arg  
 385 390 395 400  
 Thr Val Val Ser Gly Leu Val Gln Phe Val Pro Lys Glu Glu Leu Gln  
 405 410 415  
 Asp Arg Leu Val Val Leu Cys Asn Leu Lys Pro Gln Lys Met Arg  
 420 425 430  
 Gly Val Glu Ser Gln Gly Met Leu Leu Cys Ala Ser Ile Glu Gly Ile  
 435 440 445  
 Asn Arg Gln Val Glu Pro Leu Asp Pro Pro Ala Gly Ser Ala Pro Gly  
 450 455 460  
 Glu His Val Phe Val Lys Gly Tyr Glu Lys Gly Gln Pro Asp Glu Glu  
 465 470 475 480  
 Leu Lys Pro Lys Lys Lys Val Phe Glu Lys Leu Gln Ala Asp Phe Lys  
 485 490 495  
 Ile Ser Glu Glu Cys Ile Ala Gln Trp Lys Gln Thr Asn Phe Met Thr  
 500 505 510  
 Lys Leu Gly Ser Ile Ser Cys Lys Ser Leu Lys Gly Gly Asn Ile Ser  
 515 520 525

<210> 3  
 <211> 364  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3  
 Met Gly Asp Ala Pro Ser Pro Glu Glu Lys Leu His Leu Ile Thr Arg  
 1 5 10 15  
 Asn Leu Gln Glu Val Leu Gly Glu Glu Lys Leu Lys Glu Ile Leu Lys  
 20 25 30  
 Glu Arg Glu Leu Lys Ile Tyr Trp Gly Thr Ala Thr Thr Gly Lys Pro  
 35 40 45  
 His Val Ala Tyr Phe Val Pro Met Ser Lys Ile Ala Asp Phe Leu Lys

ES 2 622 444 T3

50						55						60				
Ala	Gly	Cys	Glu	Val	Thr	Ile	Leu	Phe	Ala	Asp	Leu	His	Ala	Tyr	Leu	
65					70					75					80	
Asp	Asn	Met	Lys	Ala	Pro	Trp	Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	Arg	Val	Ser	Tyr	
				85					90					95		
Tyr	Glu	Asn	Val	Ile	Lys	Ala	Met	Leu	Glu	Ser	Ile	Gly	Val	Pro	Leu	
			100					105					110			
Glu	Lys	Leu	Lys	Phe	Ile	Lys	Gly	Thr	Asp	Tyr	Gln	Leu	Ser	Lys	Glu	
		115					120					125				
Tyr	Thr	Leu	Asp	Val	Tyr	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Gln	His	Asp	
	130					135					140					
Ser	Lys	Lys	Ala	Gly	Ala	Glu	Val	Val	Lys	Gln	Val	Glu	His	Pro	Leu	
145					150					155					160	
Leu	Ser	Gly	Leu	Leu	Tyr	Pro	Gly	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Glu	Glu	Tyr	
				165					170					175		
Leu	Lys	Val	Asp	Ala	Gln	Phe	Gly	Gly	Ile	Asp	Gln	Arg	Lys	Ile	Phe	
			180					185					190			
Thr	Phe	Ala	Glu	Lys	Tyr	Leu	Pro	Ala	Leu	Gly	Tyr	Ser	Lys	Arg	Val	
		195					200						205			
His	Leu	Met	Asn	Pro	Met	Val	Pro	Gly	Leu	Thr	Gly	Ser	Lys	Met	Ser	
	210					215					220					
Ser	Ser	Glu	Glu	Glu	Ser	Lys	Ile	Asp	Leu	Leu	Asp	Arg	Lys	Glu	Asp	
225					230					235				240		
Val	Lys	Lys	Lys	Leu	Lys	Lys	Ala	Phe	Cys	Glu	Pro	Gly	Asn	Val	Glu	
				245					250					255		
Asn	Asn	Gly	Val	Leu	Ser	Phe	Ile	Lys	His	Val	Leu	Phe	Pro	Leu	Lys	
			260					265					270			
Ser	Glu	Phe	Val	Ile	Leu	Arg	Asp	Glu	Lys	Trp	Gly	Gly	Asn	Lys	Thr	
		275					280					285				
Tyr	Thr	Ala	Tyr	Val	Asp	Leu	Glu	Lys	Asp	Phe	Ala	Ala	Glu	Val	Val	
	290					295					300					
His	Pro	Gly	Asp	Leu	Lys	Asn	Ser	Val	Glu	Val	Ala	Leu	Asn	Lys	Leu	
305					310					315					320	
Leu	Asp	Pro	Ile	Arg	Glu	Lys	Phe	Asn	Thr	Pro	Ala	Leu	Lys	Lys	Leu	
				325					330					335		
Ala	Ser	Ala	Ala	Tyr	Pro	Asp	Pro	Ser	Lys	Gln	Lys	Pro	Met	Ala	Lys	
			340					345					350			
Gly	Pro	Ala	Lys	Asn	Ser	Glu	Pro	Glu	Glu	Val	Ile					
		355					360									

<210> 4  
 <211> 1683  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 4  
 atgggggacg ctcccagccc tgaagagaaa ctgcacctta tcacccgaa cctgcaggag 60  
 gttctggggg aagagaagct gaaggagata ctgaaggagc gggaaactta aatttactgg 120  
 ggaacggcaa ccacgggcaa accacatgtg gcttactttg tgcccatgtc aaagattgca 180  
 gacttcttaa aggcagggtg tgagtaaca attctgtttg cggacctcca cgcataacctg 240  
 gataacatga aagccccatg ggaacttcta gaactccgag tcagttacta tgagaatgtg 300  
 atcaaagcaa tgctggagag cattggtgtg cccttggaga agctcaagtt catcaaaggc 360  
 actgattacc agctcagcaa agagtacaca ctagatgtgt acagactctc ctccgtggtc 420  
 acacagcagc attccaagaa ggctggagct gaggtggtaa agcagggtga gcaccctttg 480  
 ctgagtggcc tcttataccc cggactgcag gctttggatg aagagtattt aaaagtagat 540  
 gcccaatttg gaggcattga tcagagaaag attttcacct ttgcagagaa gtacctccct 600  
 gcacttggct attcaaaacg ggtccatctg atgaatccta tggttccagg attaacaggc 660  
 agcaaaatga gctcttcaga agaggagtcc aagattgatc tccttgatcg gaaggaggat 720  
 gtgaagaaaa aactgaagaa ggccttctgt gagccaggaa atgtggagaa caatgggggtt 780  
 ctgtccttca tcaagcatgt cctttttccc cttaagtccg agtttgtgat cctacgagat 840

ES 2 622 444 T3

```

gagaaatggg gtggaacaa aacctacaca gcttacgtgg acctggaaaa ggactttgct 900
gctgaggttg tacatcctgg agacctgaag aattctgttg aagtcgcact gaacaagttg 960
ctggatccaa tccgggaaaa gtttaatacc cctgcctga aaaaactggc cagcgctgcc 1020
taccagatc cctcaaagca gaagccaatg gccaaaggcc ctgccaagaa ttcagaacca 1080
gaggaggtca tcccatcccg gctggatc cgtgtgggga aaatcatcac tgtggagaag 1140
caccagatg cagacagcct gtatgtagag aagattgacg tgggggaagc tgaaccacgg 1200
actgtggtga gggcctggt acagttcgtg cccaaggagg aactgcagga caggctggt 1260
gtggtgctgt gcaacctgaa accccagaag atgagaggag tcgagtccca aggcattgctt 1320
ctgtgtgctt ctatagaag gataaacccg caggttgaac ctctggacc tccggcaggc 1380
tctgctcctg gtgagcacgt gtttgtgaag ggctatgaaa agggccaacc agatgaggag 1440
ctcaagccca agaagaaagt cttcgagaag ttgcaggctg acttcaaaat ttctgaggag 1500
tgcacgcac agtggagca aaccaactc atgaccaagc tgggctccat ttctgtaaa 1560
tcgctgaaag ggggaaacat tagctagcca gccagcatc tccccctt cttccaccac 1620
tgagtcactt gctgtctctt cagtctgctc catccatcac ccatttacc atctctcagg 1680
aca 1683

```

<210> 5

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Etiqueta C-terminal

<400> 5

```

Leu Glu His His His His His His
1 5

```

<210> 6

15 <211> 348

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

20 <221> VARIANTE

<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 6

```

Xaa Lys Ile Phe Thr Phe Ala Glu
1 5 10 15
Lys Tyr Leu Pro Ala Leu Gly Tyr Ser Lys Arg Val His Leu Met Asn
20 25 30
Pro Met Val Pro Gly Leu Thr Gly Ser Lys Met Ser Ser Ser Glu Glu
35 40 45
Glu Ser Lys Ile Asp Leu Leu Asp Arg Lys Glu Asp Val Lys Lys Lys
50 55 60
Leu Lys Lys Ala Phe Cys Glu Pro Gly Asn Val Glu Asn Asn Gly Val
65 70 75 80
Leu Ser Phe Ile Lys His Val Leu Phe Pro Leu Lys Ser Glu Phe Val
85 90 95
Ile Leu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Gly Asn Lys Thr Tyr Thr Ala Tyr
100 105 110
Val Asp Leu Glu Lys Asp Phe Ala Ala Glu Val Val His Pro Gly Asp
115 120 125
Leu Lys Asn Ser Val Glu Val Ala Leu Asn Lys Leu Leu Asp Pro Ile
130 135 140
Arg Glu Lys Phe Asn Thr Pro Ala Leu Lys Lys Leu Ala Ser Ala Ala
145 150 155 160
Tyr Pro Asp Pro Ser Lys Gln Lys Pro Met Ala Lys Gly Pro Ala Lys

```

25

ES 2 622 444 T3

165 170 175  
 Asn Ser Glu Pro Glu Glu Val Ile Pro Ser Arg Leu Asp Ile Arg Val  
 180 185 190  
 Gly Lys Ile Ile Thr Val Glu Lys His Pro Asp Ala Asp Ser Leu Tyr  
 195 200 205  
 Val Glu Lys Ile Asp Val Gly Glu Ala Glu Pro Arg Thr Val Val Ser  
 210 215 220  
 Gly Leu Val Gln Phe Val Pro Lys Glu Glu Leu Gln Asp Arg Leu Val  
 225 230 235 240  
 Val Val Leu Cys Asn Leu Lys Pro Gln Lys Met Arg Gly Val Glu Ser  
 245 250 255  
 Gln Gly Met Leu Leu Cys Ala Ser Ile Glu Gly Ile Asn Arg Gln Val  
 260 265 270  
 Glu Pro Leu Asp Pro Pro Ala Gly Ser Ala Pro Gly Glu His Val Phe  
 275 280 285  
 Val Lys Gly Tyr Glu Lys Gly Gln Pro Asp Glu Glu Leu Lys Pro Lys  
 290 295 300  
 Lys Lys Val Phe Glu Lys Leu Gln Ala Asp Phe Lys Ile Ser Glu Glu  
 305 310 315 320  
 Cys Ile Ala Gln Trp Lys Gln Thr Asn Phe Met Thr Lys Leu Gly Ser  
 325 330 335  
 Ile Ser Cys Lys Ser Leu Lys Gly Gly Asn Ile Ser  
 340 345

<210> 7  
 <211> 2178  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 7

ttcagaaagt ggtggagggga agacttcctt tttcccagag acagaaggtt atgcaccag 60  
 tggcctggga ccattgttct gggctttttt tcccttcgac atggatttgc ttctcactgt 120  
 gtaccccaac caccaaaacc accctgagat caatgctggt gctcctgcat cagatggctt 180  
 agagatcctt ccacctctta acacaagcat ctagggtccac ttactctcaa tctggcctca 240  
 gttgagagca gagtatacca tcagagccca ttctctgtgc tgctgtctgg gacgtggaaa 300  
 gaaagtttagc tctaggggggt cttccagggg gcctctgtaa ggactggatg ctcctttccg 360  
 gaatccaaga gttcaccagg ctgcttctct aatggacgat gatcctcttc ctctgacgt 420  
 ctctccctgg cagcaccag atgcagacag cctgtatgta gagaagattg acgtggggga 480  
 agctgaacca cggactgtgg tgagcggcct ggtacagttc gtgcccaagg aggaactgca 540  
 ggacaggctg gtagtggtgc tgtgcaacct gaaacccag aagatgagag gagtcgagtc 600  
 ccaaggcatg cttctgtgtg cttctatgtg agtgaggact tggagtgggg cacaggacct 660  
 ggggaggcca ggaagagtag ggaatcagcc catatgatgt ccttccacac accaggtgga 720  
 agctctgaga acacgtgcct cttccttgtc gatgccaaaa gttgatgcat gaaggactta 780  
 tcgtacaagt actgttaatg aagcatttta cctacagtta atttgttaa aatagaaatg 840  
 gagggctcaa accagtacat acccaagtct tactactagt aaggagtgga gcagggattc 900  
 aatcccagt tttgatgtct ataaagtctc cgctacgtta ttttatactt cctcccctag 960  
 aaacacagat tttggtatct tgacacacaa ttttgggtata gcctgggtta atgtaaccct 1020  
 ggtgatatgc agggatgtag caagataaga ggacctcctg gggctctggt actgaggatg 1080  
 ccctaaatcc catcagggcc cctgtgtaaa ggcccggatt gctttggcct ccacagtcac 1140  
 tggaacccat ccatagcctc actcttctct tgcctgtgt cttcccagag aagggataaa 1200  
 ccgccagggt gaacctctgg acctccggc aggtctctgt cctggtgagc acgtgtttgt 1260  
 gaagggctat gaaaagggcc aaccagatga ggagctcaag cccaagagga aagtcctcga 1320  
 gaagttgcag gctgacttca aaatttctga ggagtgcac gcacagtgga agcaaaccaa 1380  
 cttcatgacc aagctgggct ccatttctctg taaatcgctg aaagggggga acattageta 1440  
 gccagcccag catcttcccc cttcttcca ccaactgagtc atctgctgtc tcttcagtct 1500  
 gctccacca tcacccattt acccatctct caggacacgg aagcagcggg tttggactct 1560  
 ttattcggtg cagaactcgg caagggcag cttaccctcc ccagaacca ggatcatcct 1620  
 gtctggctgc agtgagagac caaccctaa caagggctgg gccacagcag ggagtccagc 1680  
 cctaccttct tcccttggca gctggagaaa tctggtttca atataactca tttaaaaatt 1740  
 tatgccacag tccttataat tggaaaaata ctggtgccca ggttttcttg gagttatcca 1800

ES 2 622 444 T3

```

agcagctgcg cccctagctg ggatctggta cctggactag gctaattaca gtttctcccc 1860
aacaggaaac tgtgggattt gaaaaggaaa ggaaggaa aacagagaac ctagtggctt 1920
accaagtggg tggcaacttt cccaatgtct gcttactctg aggcttgga ctgggggcca 1980
gggcctgccc cagggtcctt ggaatttccc ttgatccagc taggctggga cactccctaa 2040
atcagctgcg tggtgttagc atcaggcaga atgaatggca gagagtgatt ctgtcttcat 2100
agagggtggg gtacttctcc ataaggcatc tcagtcaaat ccccatcact gtcataaatt 2160
caataaaaat gtctgaac 2178

```

<210> 8

<211> 388

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 8

```

Met Gly Asp Ala Pro Ser Pro Glu Glu Lys Leu His Leu Ile Thr Arg
 1          5          10          15
Asn Leu Gln Glu Val Leu Gly Glu Glu Lys Leu Lys Glu Ile Leu Lys
 20          25          30
Glu Arg Glu Leu Lys Ile Tyr Trp Gly Thr Ala Thr Thr Gly Lys Pro
 35          40          45
His Val Ala Tyr Phe Val Pro Met Ser Lys Ile Ala Asp Phe Leu Lys
 50          55          60
Ala Gly Cys Glu Val Thr Ile Leu Phe Ala Asp Leu His Ala Tyr Leu
 65          70          75          80
Asp Asn Met Lys Ala Pro Trp Glu Leu Leu Glu Leu Arg Val Ser Tyr
 85          90          95
Tyr Glu Asn Val Ile Lys Ala Met Leu Glu Ser Ile Gly Val Pro Leu
 100         105         110
Glu Lys Leu Lys Phe Ile Lys Gly Thr Asp Tyr Gln Leu Ser Lys Glu
 115         120         125
Tyr Thr Leu Asp Val Tyr Arg Leu Ser Ser Val Val Thr Gln His Asp
 130         135         140
Ser Lys Lys Ala Gly Ala Glu Val Val Lys Gln Val Glu His Pro Leu
 145         150         155         160
Leu Ser Gly Leu Leu Tyr Pro Gly Leu Gln Ala Leu Asp Glu Glu Tyr
 165         170         175
Leu Lys Val Asp Ala Gln Phe Gly Gly Ile Asp Gln Arg Lys Ile Phe
 180         185         190
Thr Phe Ala Glu Lys Tyr Leu Pro Ala Leu Gly Tyr Ser Lys Arg Val
 195         200         205
His Leu Met Asn Pro Met Val Pro Gly Leu Thr Gly Ser Lys Met Ser
 210         215         220
Ser Ser Glu Glu Glu Ser Lys Ile Asp Leu Leu Asp Arg Lys Glu Asp
 225         230         235         240
Val Lys Lys Lys Leu Lys Lys Ala Phe Cys Glu Pro Gly Asn Val Glu
 245         250         255
Asn Asn Gly Val Leu Ser Phe Ile Lys His Val Leu Phe Pro Leu Lys
 260         265         270
Ser Glu Phe Val Ile Leu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Gly Asn Lys Thr
 275         280         285
Tyr Thr Ala Tyr Val Asp Leu Glu Lys Asp Phe Ala Ala Glu Val Val
 290         295         300
His Pro Gly Asp Leu Lys Asn Ser Val Glu Val Ala Leu Asn Lys Leu
 305         310         315         320

```

15

ES 2 622 444 T3

Leu Asp Pro Ile Arg Glu Lys Phe Asn Thr Pro Ala Leu Lys Lys Leu  
 325 330 335  
 Ala Ser Ala Ala Tyr Pro Asp Pro Ser Lys Gln Lys Pro Met Ala Lys  
 340 345 350  
 Gly Xaa  
 355 360 365  
 Xaa  
 370 375 380  
 Xaa Xaa Xaa Xaa  
 385

<210> 9  
 <211> 1167  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 9  
 atgggggacg ctcccagccc tgaagagaaa ctgcaccta tcacccggaa cctgcaggag 60  
 gttctggggg aagagaagct gaaggagata ctgaaggagc ggaacttaa aatttactgg 120  
 ggaacggcaa ccacgggcaa accacatgtg gcttactttg tgcccatgtc aaagattgca 180  
 gacttcttaa aggcagggtg tgaggtaaca attctgtttg cggacctcca cgcatacctg 240  
 gataacatga aagccccatg ggaacttcta gaactccgag tcagttacta tgagaatgtg 300  
 atcaaagcaa tgctggagag cattgggtgtg cccttgagaga agctcaagtt catcaaaggc 360  
 actgattacc agctcagcaa agagtacaca ctagatgtgt acagactctc ctccgtggtc 420  
 acacagcacg attccaagaa ggctggagct gaggtggtaa agcaggtgga gcacccttg 480  
 ctgagtggcc tcttataccc cggactgcag gctttggatg aagagtattt aaaagtagat 540  
 gcccaatttg gaggcattga tcagagaaaag attttcacct ttgcagagaa gtacctccct 600  
 gcacttggct attcaaaacg ggtccatctg atgaatccta tggttccagg attaacaggc 660  
 agcaaaatga gctcttcaga agaggagtcc aagattgatc tccttgatcg gaaggaggat 720  
 gtgaagaaaa aactgaagaa ggccttctgt gagccaggaa atgtggagaa caatgggggt 780  
 ctgtccttca tcaagcatgt cctttttccc ctttaagtcc agtttgtgat cctacgagat 840  
 gagaaatggg gtggaacaa aacctacaca gcttacgtgg acctggaaaa ggactttgct 900  
 gctgagggtg tacatcctgg agacctgaag aattctgttg aagtcgcact gaacaagttg 960  
 ctggatccaa tccgggaaaa gtttaatacc cctgcacctga aaaaactggc cagcgcctgc 1020  
 taccagatc cctcaaagca gaagccaatg gccaaaggcc tgccaagaat tcagaaccag 1080  
 aggaggtcat cccatcccgg ctggatatcc gtgtggggaa aatcatcact gtggagaagc 1140  
 acccagatgc agacagcctg tatgtag 1167

10

<210> 10  
 <211> 318  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15

<400> 10  
 Met Asn Pro Met Val Pro Gly Leu Thr Gly Ser Lys Met Ser Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Glu Ser Lys Ile Asp Leu Leu Asp Arg Lys Glu Asp Val Lys  
 20 25 30  
 Lys Lys Leu Lys Lys Ala Phe Cys Glu Pro Gly Asn Val Glu Asn Asn  
 35 40 45  
 Gly Val Leu Ser Phe Ile Lys His Val Leu Phe Pro Leu Lys Ser Glu  
 50 55 60  
 Phe Val Ile Leu Arg Asp Glu Lys Trp Gly Gly Asn Lys Thr Tyr Thr  
 65 70 75 80  
 Ala Tyr Val Asp Leu Glu Lys Asp Phe Ala Ala Glu Val Val His Pro  
 85 90 95  
 Gly Asp Leu Lys Asn Ser Val Glu Val Ala Leu Asn Lys Leu Leu Asp  
 100 105 110  
 Pro Ile Arg Glu Lys Phe Asn Thr Pro Ala Leu Lys Lys Leu Ala Ser  
 115 120 125

ES 2 622 444 T3

Ala Ala Tyr Pro Asp Pro Ser Lys Gln Lys Pro Met Ala Lys Gly Pro  
 130 135 140  
 Ala Lys Asn Ser Glu Pro Glu Glu Val Ile Pro Ser Arg Leu Asp Ile  
 145 150 155 160  
 Arg Val Gly Lys Ile Ile Thr Val Glu Lys His Pro Asp Ala Asp Ser  
 165 170 175  
 Leu Tyr Val Glu Lys Ile Asp Val Gly Glu Ala Glu Pro Arg Thr Val  
 180 185 190  
 Val Ser Gly Leu Val Gln Phe Val Pro Lys Glu Glu Leu Gln Asp Arg  
 195 200 205  
 Leu Val Val Val Leu Cys Asn Leu Lys Pro Gln Lys Met Arg Gly Val  
 210 215 220  
 Glu Ser Gln Gly Met Leu Leu Cys Ala Ser Ile Glu Gly Ile Asn Arg  
 225 230 235 240  
 Gln Val Glu Pro Leu Asp Pro Pro Ala Gly Ser Ala Pro Gly Glu His  
 245 250 255  
 Val Phe Val Lys Gly Tyr Glu Lys Gly Gln Pro Asp Glu Glu Leu Lys  
 260 265 270  
 Pro Lys Lys Lys Val Phe Glu Lys Leu Gln Ala Asp Phe Lys Ile Ser  
 275 280 285  
 Glu Glu Cys Ile Ala Gln Trp Lys Gln Thr Asn Phe Met Thr Lys Leu  
 290 295 300  
 Gly Ser Ile Ser Cys Lys Ser Leu Lys Gly Gly Asn Ile Ser  
 305 310 315

<210> 11  
 <211> 1736  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 11  
 gaaagatttt cacctttgca gagaagtacc tcctgcaact tggctattca aaacgggtcc 60  
 atctgatgaa tcctatgggt ccaggattaa caggcagcaa aatgagctct tcagaagagg 120  
 agtccaagat tgatctcctt gatcggaagg aggatgtgaa gaaaaaactg aagaaggcct 180  
 tctgtgagcc aggaaatgtg gagaacaatg ggttctgtc cttcatcaag catgtccttt 240  
 ttccccttaa gtccgagttt gtgatcctac gagatgagaa atgggggtgga aacaaaacct 300  
 acacagctta cgtggacctg gaaaaggact ttgctgctga ggttgtagat cctggagacc 360  
 tgaagaattc tgttgaagtc gcaactgaaca agttgctgga tccaatccgg gaaaagtta 420  
 atacccttcg cctgaaaaaa ctggccagcg ctgcctacct agatccctca aagcagaagc 480  
 caatggccaa aggcctgccc aagaattcag aaccagagga ggtcatccca tcccggctgg 540  
 atatcctgtg ggggaaaatc atcactgtgg agaagcacc agatgcagac agcctgtatg 600  
 tagagaagat tgacgtgggg gaagctgaac cacggactgt ggtgagcggc ctggtacagt 660  
 tcgtgcccac ggaggaactg caggacaggc tggtagtggg gctgtgcaac ctgaaacccc 720  
 agaagatgag aggagtgcag tccaaggca tgcttctgtg tgcttctata gaagggataa 780  
 accgccaggt tgaacctctg gaccctccgg caggctctgc tcctgggtgag cacgtgtttg 840  
 tgaagggcta tgaaaagggc caaccagatg aggagctcaa gcccaagaag aaagtcttcg 900  
 agaagttgca ggctgacttc aaaatttctg aggagtgcac cgcacagtgg aagcaaacca 960  
 acttcatgac caagctgggc tccatttcct gtaaatoget gaaagggggg aacattagct 1020  
 agccagccca gcatcttccc cccttcttcc accactgagt catctgctgt ctcttcagtc 1080  
 tgctccatcc atcaccatt taccatctc tcaggacacg gaagcagcgg gtttgactc 1140  
 tttattcggg gcagaactcg gcaaggggca gcttaccctc cccagaacct aggatcatcc 1200  
 tgtctggctg cagtgcagaa ccaaccctca acaagggctg ggccacagca gggagtccag 1260  
 ccctaccttc ttcccttggc agctggagaa atctggtttc aatataactc atttaaaaat 1320  
 ttatgccaca gtccttataa ttggaaaaat actggtgccc aggttttctt ggagttatcc 1380  
 aagcagctgc gccctagct gggatctggt acctggacta ggctaattac agcttctccc 1440  
 caacaggaaa ctgtgggatt tgaaaaggaa agggaaggga aaacagagaa cctagtggct 1500  
 taccagtgg ttggcaact tccaatgtc tcttactct gaggcttggc actggggggc 1560  
 agggcctgcc ccaggctcc tggaatttcc ttgatccag ctaggctggg acactcccta 1620  
 aatcagctgc gtgtgttag catcaggcag aatgaatggc agagagtgat tctgtcttca 1680  
 tagaggggtg ggtacttctc cataaggcat ctgagctcaa tccccatcac tgtcat 1736

10

<210> 12  
 <211> 179

ES 2 622 444 T3

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 12

```

Met Ala Lys Gly Pro Ala Lys Asn Ser Glu Pro Glu Glu Val Ile Pro
 1      5      10      15
Ser Arg Leu Asp Ile Arg Val Gly Lys Ile Ile Thr Val Glu Lys His
      20      25      30
Pro Asp Ala Asp Ser Leu Tyr Val Glu Lys Ile Asp Val Gly Glu Ala
      35      40      45
Glu Pro Arg Thr Val Val Ser Gly Leu Val Gln Phe Val Pro Lys Glu
      50      55      60
Glu Leu Gln Asp Arg Leu Val Val Val Leu Cys Asn Leu Lys Pro Gln
      65      70      75      80
Lys Met Arg Gly Val Glu Ser Gln Gly Met Leu Leu Cys Ala Ser Ile
      85      90      95
Glu Gly Ile Asn Arg Gln Val Glu Pro Leu Asp Pro Pro Ala Gly Ser
      100      105      110
Ala Pro Gly Glu His Val Phe Val Lys Gly Tyr Glu Lys Gly Gln Pro
      115      120      125
Asp Glu Glu Leu Lys Pro Lys Lys Lys Val Phe Glu Lys Leu Gln Ala
      130      135      140
Asp Phe Lys Ile Ser Glu Glu Cys Ile Ala Gln Trp Lys Gln Thr Asn
      145      150      155      160
Phe Met Thr Lys Leu Gly Ser Ile Ser Cys Lys Ser Leu Lys Gly Gly
      165      170      175

```

5 Asn Ile Ser

<210> 13  
<211> 1167  
<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 13

```

atgggggacg ctcccagccc tgaagagaaa ctgcacctta tcaccoggaa cctgcaggag 60
gttctggggg aagagaagct gaaggagata ctgaaggagc gggaaactta aatttactgg 120
ggaacggcaa ccacgggcaa accacatgtg gcttactttg tgcccatgtc aaagattgca 180
gacttcttaa aggcagggtg tgaggtaaca attctgtttg cggacctcca cgcatacctg 240
gataacatga aagccccatg ggaacttcta gaactccgag tcagttacta tgagaatgtg 300
atcaaagcaa tgctggagag cattggtgtg cccttgagag agctcaagtt catcaaaggc 360
actgattacc agctcagcaa agagtacaca ctagatgtgt acagactctc ctccgtggtc 420
acacagcagc attccaagaa ggctggagct gaggtggtaa agcagggtgga gcaccctttg 480
ctgagtggcc tcttataccc cggactgcag gctttggatg aagagtattt aaaagtagat 540
gcccatttg gaggcattga tcagagaaaag attttcacct ttgcagagaa gtacctccct 600
gcacttggct attcaaaacg ggtccatctg atgaatccta tggttccagg attaacaggc 660
agcaaatga gctcttcaga agaggagtcc aagattgatc tccttgatcg gaaggaggat 720
gtgaagaaaa aactgaagaa ggccttctgt gagccaggaa atgtggagaa caatgggggt 780
ctgtccttca tcaagcatgt cctttttccc cttaagtccg agtttgtgat cctacgagat 840
gagaaatggg gtggaaacaa aacctacaca gcttacgtgg acctggaaaa ggactttgct 900
gctgaggttg tacatcctgg agacctgaag aattctgttg aagtcgcact gaacaagttg 960
ctggatccaa tccgggaaaa gtttaatacc cctgcctgaa aaaaactggc cagcgctgcc 1020
taccagatc cctcaaagca gaagccaatg gccaaaggcc tgccaagaat tcagaaccag 1080
aggaggtcat cccatcccgg ctggatatcc gtgtggggaa aatcatcact gtggagaagc 1140
accagatgc agacagcctg tatgtag 1167

```

15 <210> 14  
<211> 188  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

20 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8  
<223> Xaa = cualquier aminoácido

ES 2 622 444 T3

<400> 14

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Met Ala Lys Gly Pro Ala Lys  
 1 5 10 15  
 Asn Ser Glu Pro Glu Glu Val Ile Pro Ser Arg Leu Asp Ile Arg Val  
 20 25 30  
 Gly Lys Ile Ile Thr Val Glu Lys His Pro Asp Ala Asp Ser Leu Tyr  
 35 40 45  
 Val Glu Lys Ile Asp Val Gly Glu Ala Glu Pro Arg Thr Val Val Ser  
 50 55 60  
 Gly Leu Val Gln Phe Val Pro Lys Glu Glu Leu Gln Asp Arg Leu Val  
 65 70 75 80  
 Val Val Leu Cys Asn Leu Lys Pro Gln Lys Met Arg Gly Val Glu Ser  
 85 90 95  
 Gln Gly Met Leu Leu Cys Ala Ser Ile Glu Gly Ile Asn Arg Gln Val  
 100 105 110  
 Glu Pro Leu Asp Pro Pro Ala Gly Ser Ala Pro Gly Glu His Val Phe  
 115 120 125  
 Val Lys Gly Tyr Glu Lys Gly Gln Pro Asp Glu Glu Leu Lys Pro Lys  
 130 135 140  
 Lys Lys Val Phe Glu Lys Leu Gln Ala Asp Phe Lys Ile Ser Glu Glu  
 145 150 155 160  
 Cys Ile Ala Gln Trp Lys Gln Thr Asn Phe Met Thr Lys Leu Gly Ser  
 165 170 175  
 Ile Ser Cys Lys Ser Leu Lys Gly Gly Asn Ile Ser  
 180 185

- 5 <210> 15
- <211> 2262
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

10 <400> 15

gccagacaca gtggctcaca cctgtaatct taacactttg gaaggctgag gcaggcggat 60  
 cacttgagcc caaaagttag agacccaaac ccagctctca cccaaaaaaa aaaaaaaaaa 120  
 aaaaattagc caggcatagt agcacatgcc tgtagtccca gctacttggg aggctgaggt 180  
 gagaggatca cctgagcatg ggggaagttga gactgcagtg agccatgatc gcaccactgc 240  
 actccagcct gggcaacaga gtgagactct atgtctcaa aaaagaaaaa tgatagaaat 300  
 tagattagac ctattatacc caaccgggat atagggtatc gatagtttct tacacagctg 360  
 ttgggcagag cctgcagagc ttagagaagc ttatctttag attctcccag tttccttcta 420  
 tgtgcatggg cctggctctt agttggccat ccacttgtgc gtaatgctaa gatattggca 480  
 ttgatagctt tgtgcgacct ttocagaaaa aaactcagta actcagtaaa attttttttt 540  
 ttttttctaa aagagacaga gtctggctct gttgcccagc ctggtcttga agtcctgggc 600  
 ttaagcaatc ctcccgtctc agcctcccaa agtgctagaa ttacagggtg gagctaccac 660  
 acctggccaa gactcagtaa attctatgtg gaatgcatga atggaaatac ctaaaggagg 720  
 caaagctact actgctccct ccccgctagt ctaataattg agggagagaa cagatgaaaa 780  
 tcaggatgtg catgtctgaa aggttgccaa cccagtatta aagaagttac aactcagtgt 840  
 ttagactctg gggattctac actaaatctt acctaatctc agtgtcttaa cgtgggtggga 900  
 tcagcagctg acctgccaca gggaagaatt ctacctcatg gggttcttct cattcccaga 960  
 gccaatggcc aaaggccctg ccaagaattc agaaccagag gaggtcatcc catcccggct 1020  
 ggatatccgt gtgggaaaaa tcatcactgt ggagaagcac ccagatgcag acagcctgta 1080  
 ttagagaag attgacgtgg ggggaagctga accacggact gtggtgagcg gcctggtaca 1140

ES 2 622 444 T3

```

gttcgtgcc aaggaggaac tgcaggacag gctggtagtg gtgctgtgca acctgaaacc 1200
ccagaagatg agaggagtcg agtcccaagg catgcttctg tgtgcttcta tagaagggat 1260
aaaccgccag gttgaacctc tggacctcc ggaggctct gctcctggg agcacgtgtt 1320
tgtgaagggc tatgaaaagg gccaacccaga tgaaggagctc aagcccaaga agaaagtctt 1380
cgagaagttg caggctgact tcaaaatttc tgaggagtgc atcgcacagt ggaagcaaac 1440
caacttcatg accaagctgg gctccatttc ctgtaaatcg ctgaaagggg ggaacattag 1500
ctagccagcc cagcatcttc cccccttctt ccaccactga gtcactctgt gtctcttcag 1560
tctgctccat ccatcaccca tttaccatc tctcaggaca cggaagcagc gggtttgac 1620
tctttattcg gtgcagaact cggcaagggg cagcttacc tcccagaac ccaggatcat 1680
cctgtctggc tgcagtgaga gaccaacccc taacaagggc tgggccacag cagggagtcc 1740
agccctacct tcttcccttg gcagctggag aaatctgggt tcaatataac tcatttaaaa 1800
atztatgcca cagtccttat aattggaaaa atactggtgc ccaggttttc ttggagttat 1860
ccaagcagct gcgccctag ctgggatctg gtacctggac taggctaatt acagcttctc 1920
ccaacagga aactgtggga tttgaaaagg aaaggggaagg gaaaacagag aacctagtgg 1980
tctaccaagt ggttgcaac tttccaatg tctgcttact ctgaggcttg gcaactgggg 2040
ccagggcctg cccagggtc octggaattt cccttgatcc agctaggctg ggacactccc 2100
taaatcagct gcgtgtgtt agcatcaggc agaatgaatg gcagagagtg attctgtctt 2160
catagaggtt ggggtacttc tccataaggc atctcagtca aatccccatc actgtcataa 2220
attcaaataa aatgtctgaa caagggaaaa aaaaaaaaaa aa 2262

```

## REIVINDICACIONES

1. Una composición para uso en tratar, o reducir el riesgo de desarrollar, trombocitopenia en un sujeto, o para aumentar o mantener recuentos de plaquetas en un sujeto, que comprende una concentración trombopoyéticamente eficaz de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa, en donde el sujeto tiene, o está en riesgo de tener, una enfermedad o afección asociada con un recuento de plaquetas disminuido o reducido.
2. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde el sujeto tiene un recuento de plaquetas de aproximadamente  $150.00/\text{mm}^3$  o menor.
3. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde la enfermedad o afección se selecciona de hemorragia y hematomas, epistaxis, hiperesplenismo, hipotermia, infección por virus de Epstein-Barr, mononucleosis infecciosa, síndrome de Wiskott-Aldrich, ingestión materna de tiacidas, trombocitopenia amegacariocítica congénita, síndrome de trombocitopenia con aplasia radial, anemia de Fanconi, síndrome de Bernard-Soulier, anomalía de May-Hegglin, síndrome de plaquetas grises, síndrome de Alport, rubeola neonatal, anemia aplásica, síndrome mielodisplásico, leucemia, linfoma, tumor, cáncer de la médula ósea, deficiencia nutricional, exposición a radiación, insuficiencia hepática, septicemia bacteriana, sarampión, fiebre dengue, infección por VIH o SIDA, prematuridad, eritroblastosis fetal, purpura trombocitopénica idiopática (PTI), PTI materna, síndrome hemolítico-urémico, coagulación intravascular diseminada, purpura trombocitopénica trombótica (PTT), purpura postransfusión, lupus eritematosos sistémico, artritis reumatoide, trombocitopenia aloinmunitaria neonatal, y hemoglobinuria nocturna paroxística, infección por virus de la hepatitis C (VHC), trombocitopenia inducida por medicación, y trombocitosis inducida por quimioterapia (CIT).
4. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde la enfermedad o afección está inducida por una medicación o fármaco.
5. La composición para uso según la reivindicación 4, en donde la medicación o fármaco se selecciona de agentes quimioterapéuticos, agentes antiinflamatorios no esteroideos, sulfonamidas, vancomicina, clopidogrel, inhibidores de glucoproteína IIb/IIIa, interferones, ácido valproico, abciximab, linezolid, famotidina, mebeverina, bloqueantes de histamina, agentes alquilantes, heparina, alcohol y agentes quimioterapéuticos antibióticos.
6. La composición para uso según la reivindicación 5, en donde el agente quimioterapéutico se selecciona de cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbacin, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, nitrosurea, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión al receptor de estrógeno, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de farnesil-proteína transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, temazolomida y derivados de los mismos.
7. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa se selecciona de
  - a) una tirosil-ARNt sintetasa de mamífero truncada en su extremo C o su extremo N,
  - b) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, o 14, en donde al menos aproximadamente 1-50, 50-100, 100-150, 150-200 o 200-250 residuos de aminoácidos están truncados de su extremo C o su extremo N,
  - c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, en donde la alanina en la posición 341 no está sustituida con una tirosina,
  - d) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, o 14; y
  - e) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, o 14; y
  - f) un polipéptido que consiste esencialmente en los aminoácidos 1-353 de SEQ ID NO: 1.
8. La composición para uso según la reivindicación 1, que comprende además un segundo polipéptido tirosil-ARNt sintetasa, en donde los dos polipéptidos tirosil-ARNt-sintetasa forman un heterodímero o un homodímero.
9. La composición para uso según la reivindicación 8, en donde el heterodímero comprende un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa de longitud completa y un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa truncado.
10. La composición para uso según la reivindicación 1, que comprende además un polipéptido heterólogo, en donde el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa y el polipéptido heterólogo forman un heterodímero.

11. La composición para uso según la reivindicación 1, en donde el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa es un polipéptido quimérico seleccionado de
- 5 (a) un polipéptido quimérico que comprende dos o más fragmentos biológicamente activos de al menos 10 aminoácidos contiguos de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa, en donde los dos o más fragmentos están unidos para formar un polipéptido quimérico que es capaz de estimular trombopoyesis y/o aumentar el recuento de plaquetas en un sujeto; y
- 10 (b) uno o más fragmentos biológicamente activos de al menos 10 aminoácidos contiguos de un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa y uno o más polipéptidos heterólogos, en donde el uno o más fragmentos y el uno o más polipéptidos heterólogos están unidos para formar un polipéptido quimérico que es capaz de estimular trombopoyesis y/o aumentar el recuento de plaquetas en un sujeto.
12. Una composición para uso en tratar trombocitopenia, dicha composición comprende un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
- 15 13. La composición para uso según la reivindicación 12, en donde el polinucleótido aislado comprende una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4, 7, 9, 11, 13, o 15, o una secuencia de nucleótidos al menos el 80% idéntica a SEQ ID NO: 4, 7, 9, 11, 13, o 15.
- 20 14. Un método *ex vivo* o *in vitro* para estimular la proliferación y/o diferenciación de células progenitoras de megacariocitos tempranas, que comprende incubar un cultivo de células madre hematopoyéticas con un polipéptido tirosil-ARNt sintetasa durante un tiempo suficiente para permitir la proliferación de las células progenitoras de megacariocitos tempranas, estimulando de esta manera la proliferación y/o diferenciación de células progenitoras de megacariocitos tempranas.
- 25 15. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el polipéptido tirosil-ARNt sintetasa está fusionado a un polipéptido heterólogo.
- 30 16. La composición para uso según la reivindicación 15, en donde el polipéptido heterólogo comprende un fragmento Fc.
17. La composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el polipéptido está modificado por pegilación.

ES 2 622 444 T3

10 20 30 40 50  
MGDAPSPEEK LHLITRNLQE VLGEEKLKEI LKERELKIYW GTATTGKPHV

60 70 80 90 100  
AYFVPMSKIA DFLKAGCEVT ILFADLHAYL DNMKAPWELL ELRVSYEYENV

110 120 130 140 150  
IKAMLESIGV PLEKLFKFIKG TDYQLSKEYT LDVYRLSSVV TQHDSKKAGA

160 170 180 190 200  
EVMKQVEHPL LSGLLYPGLQ ALDEEYLKVD AQFGGIDQRK IFTFAEKYLP

210 220 230 240 250  
ALGYSKRVHL MNPMPVPLTG SKMSSSEEEES KIDLLDRKED VKKKLKAFC

260 270 280 290 300  
EPGNVENNGV LSFVHVLFP LKSEFVILRD EKWGGNKTYT AYVDLEKDF

310 320 330 340 350  
AEVVHPGDLK NSVEVALNKL LDPIREKFNT PALKKLAASAA YPDPSKQKPM

360 370 380 390 400  
AKGPAKNSEP EEVIPSRLDI RVGKIITVEK HPDADSLYVE KIDVGEAEPR

410 420 430 440 450  
TVVSGLVQFV PKEELQDRLV VVLCNLKPQK MRGVESQGML LCASIEGINR

460 470 480 490 500  
QVEPLDPPAG SAPGEHV FVK GYEKGQPDEE LKPKKKVFEK LQADFKISEE

510 520  
CIAQWKQTNF MTKLGSISCK SLKGGNIS (SEQ ID NO:1)

*FIG. 1*

## ES 2 622 444 T3

10 20 30 40 50  
MGDAPSPPEEK LHLITRNLQE VLGEEKLKEI LKERELKIYW GTATTGKPHV

60 70 80 90 100  
AYFVPMSKIA DFLKAGCEVT ILFADLHAYL DNMKAPWELL ELRVSYENV

110 120 130 140 150  
IKAMLESIGV PLEKLFKFIKG TDYQLSKEYT LDVYRLSSVV TQHDSKKAGA

160 170 180 190 200  
EVVKQVEHPL LSGLLYPGLQ ALDEEYLKVD AQFGGIDQRK IFTFAEKYLP

210 220 230 240 250  
ALGYSKRVHL MNPMVPGLTG SKMSSSEEEES KIDLLDRKED VKKKLKKAFK

260 270 280 290 300  
EPGNVENNGV LSFVKHVLFP LKSEFVILRD EKWGGNKTYT AYVDLEKDFK

310 320 330 340 350  
AEVVHPGDLK NSVEVALNKL LDPIREKFNT PALKKLASAA ~~A~~PDPSKQKPM

360 370 380 390 400  
AKGPAKNSEP **EEVI**PSRLDI RVGKIITVEK HPDADSLYVE KIDVGAEPR

410 420 430 440 450  
TVVSGLVQFV PKEELQDRLV VVLCNLKPQK MRGVESQGML LCASIEGINR

460 470 480 490 500  
QVEPLDPPAG SAPGEHV FVK GYEKGQPDEE LKPKKKVFEK LQADFKISEE

510 520  
CIAQWKQTNF MTKLGSISCK SLKGGNIS (SEQ ID NO:2)

*FIG. 2*

ES 2 622 444 T3

10 20 30 40 50  
MGDAPSPEEK LHLITRNLQE VLGEEKLKEI LKERELKIYW GTATTGKPHV

60 70 80 90 100  
AYFVPMSKIA DFLKAGCEVT ILFADLHAYL DNMKAPWELL ELRVSYENV

110 120 130 140 150  
IKAMLESIGV PLEKLFIFKG TDYQLSKEYT LDVYRLSSV TQHDSKKAGA

160 170 180 190 200  
EVLKQVEHPL LSGLLYPGLQ ALDEEYLKVD AQFGGIDQRK IFTFAEKYLP

210 220 230 240 250  
ALGYSKRVHL MNPMVPGLTG SKMSSSEES KIDLLDRKED VKKLLKKAFC

260 270 280 290 300  
EPGNVENNGV LSFIKHVLFP LKSEFVILRD EKWGGNKTYT AYVDLEK DFA

310 320 330 340 350  
AEVVHPGDLK NSVEVALNKL LDPIREKFNT PALKKLASAA YPDPSKQKPM

360  
AKGPAKNSEP EEVI (SEQ ID NO:3)

*FIG. 3*

1 atgggggacg ctcccagccc tgaagagaaaa ctgcacctta tcacccggaa cctgcaggag  
 61 gttctggggg aagagaagct gaaggagata ctgaaggagc gggaaacttaa aatttactgg  
 121 ggaacggcaa ccacgggcaa accacatgtg gcttactttg tgcccatgtc aaagattgca  
 181 gacttcttaa aggcaggggtg tgaggtaaca attctgtttg cggacctcca cgcataacctg  
 241 gataacatga aagccccatg gaaacttcta gaactccgag tcagttacta tgagaaatgtg  
 301 atcaaaagcaa tgctggagag cattgggtgtg cccttggaga agctcaagtt catcaaaaggc  
 361 actgattacc agctcagcaa agagtacaca ctagatgtgt acagactctc ctccgtggtc  
 421 acacagcacg attccaagaa ggctggagct gaggtggtaa agcaggtgga gcaccctttg  
 481 ctgagtgccc tcttataccc cggactgcag gctttggatg aagagtattt aaaagtagat  
 541 gcccattttg gaggcattga tcagagaaaag attttcaact ttgcagagaa gtacctccct  
 601 gcacttggct attcaaaacg gttccatctg atgaatccta tggttccagg attaacaggc  
 661 agcaaaatga gctcttcaga agaggagtcc aagattgac tccttgatcg gaaggaggat  
 721 gtgaagaaaa aactgaagaa ggccctctgt gagccagaaa atgtggagaa caatgggggtt  
 781 ctgtccttca tcaagcatgt ccttttccc cttaagtccg agtttgtgat cctacgagat  
 841 gagaaatggg gtggaacaaa acctacaca gcttacgttg acctggaaaa ggactttgct  
 901 gctgaggttg tacatcctgg agacctgaag aattctgttg aagtcgact gaacaaagtgtg  
 961 ctggatccaa tccgggaaaa gtttaatacc cctgcccctga aaaaactggc cagcgtgccc  
 1021 taccagatc cctcaaaagca gaagccaatg gccaaaaggcc ctgccaagaa ttcagaacca  
 1081 gaggaggtca tcccataccc gctggatata cgtgtgggga aaatcatcac tgtggagaag  
 1141 caccagatg cagacagcct gtatgtagag aagattgacg tgggggaaagc tgaaccacgg  
 1201 actgtggtga gcggcctggt acagtctgtg cccaaggagg aactgcagga caggctggtg  
 1261 gtggtgctgt gcaacctgaa accccagaag atgagaggag tcgagtccca aggcattgctt  
 1321 ctgtgtgctt ctatagaagg gataaacccg caggttgaac ctctggaccc tccggcagggc  
 1381 tctgtctctg gtgagcacgt gtttgtgaag ggctatgaaa agggccaacc agatgaggag  
 1441 ctcaagccca agaagaaaagt cttcgagaag ttgcaggctg acttcaaaaat ttctgaggag  
 1501 tgcatagcac agtggaaagca acccaacttc atgaccaagc tgggctccat ttccctgtaa  
 1561 tcgctgaaaag gggggaacat tagctagcca gcccagcatc ttccccctt ctcccacc  
 1621 tgagtcatct gctgtctctt cagttctctc catccatcac ccatttacc atctctcagg  
 1681 aca (SEQ ID NO:4)

**FIG. 4**

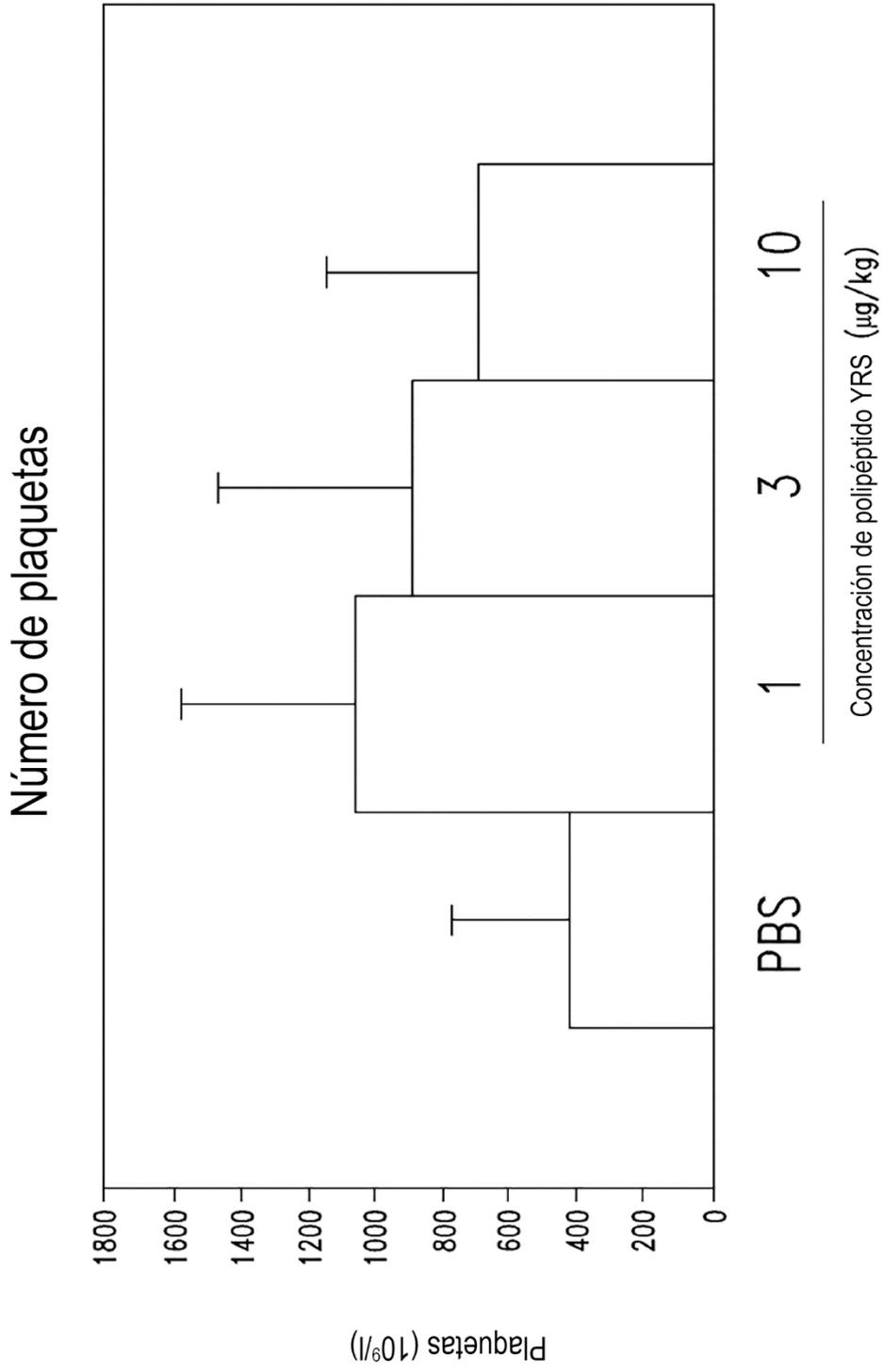
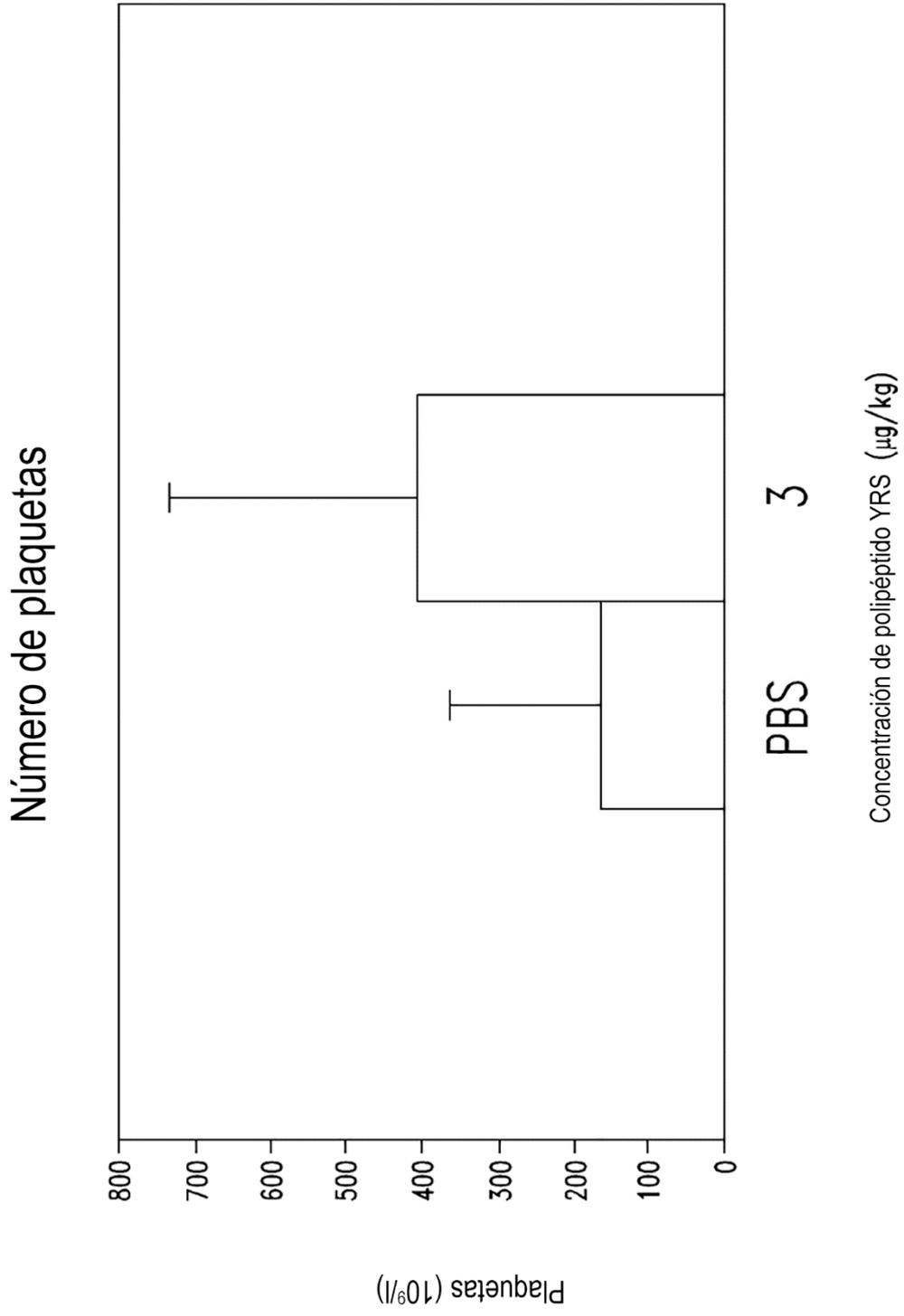


FIG. 5A



*FIG. 5B*

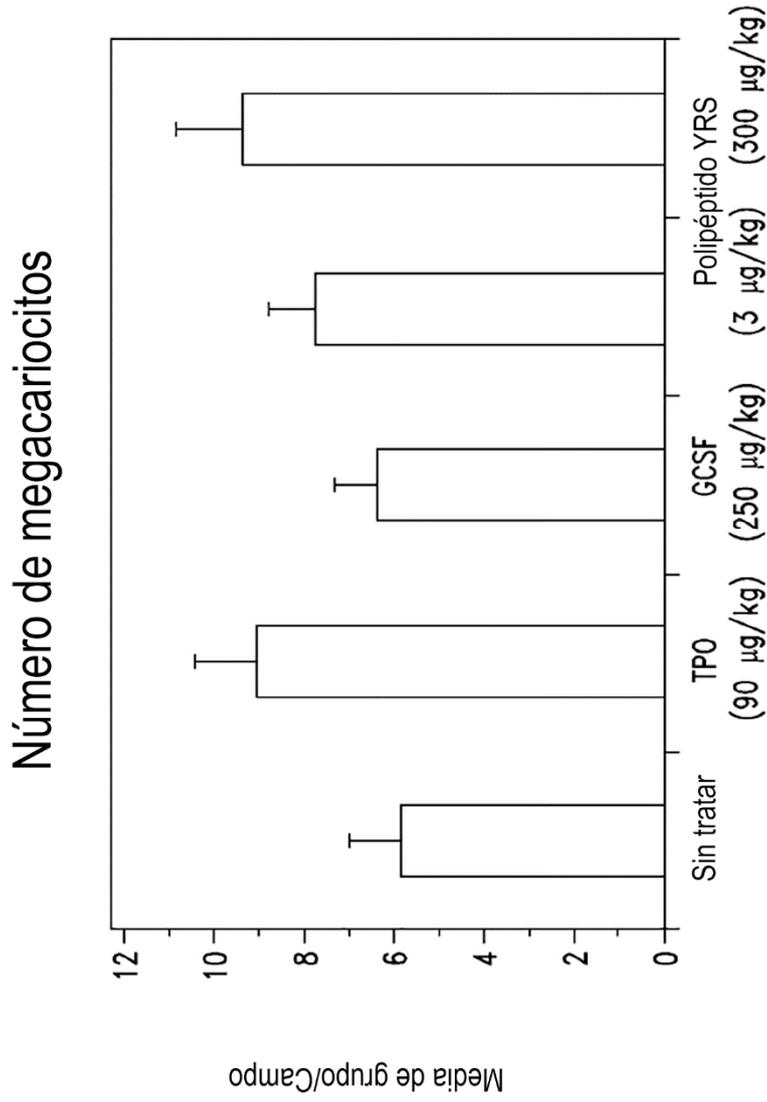


FIG. 6

SP1

```

      10          20          30          40          50
XXXXXXXXXXK IFTFAEKYLP ALGYSKRVHL MNPMVPGLTG SKMSSSEES

      60          70          80          90         100
KIDLLDRKED VKKCLKKAFK EPGNVENNGV LSFIKHVLFP LKSEFVILRD

     110         120         130         140         150
EKWGGNKTYT AYVDLEKDFK AEVVHPGDLK NSVEVALNKL LDPIREKENT

     160         170         180         190         200
PALKKLASAA YPDPSKQKPM AKGPAKNSEP EEVIPSRLDI RVGKIITVEK

     210         220         230         240         250
HPDADSLYVE KIDVGAEPR TVVSGLVQFV PKEELQDRLV VVLCNLKPQK

     260         270         280         290         300
MRGVESQGML LCASIEGINR QVEPLDPPAG SAPGEHVFVK GYEKGQPDEE

     310         320         330         340
LKPKKKVFKE LQADFKISEE CIAQWKQTNF MTKLGSISCK SLKGGNIS
(SEQ ID NO:6)

```

*FIG. 7*

ADNc que codifica SP1

```

1 ttcagaaagt ggtggagggga agacttcctt tttcccagag acagaaggtt atgcaccag
61 tggcctggga ccattgttct gggctttttt tcccttgcac atggatttgc ttctcactgt
121 gtacccaac caccaaaacc accctgagat caatgctggg gctcctgcat cagatggctt
181 agagatcctt ccacctetta acacaagcat ctagggtccac tttactcaaa tetggcctca
241 gttgagagca gagtatacca tcagagccca ttctcctgtc tgctgtctgg gacgtggaaa
301 gaaagttagc tctagggggg ctttccaggg gcctctgtaa ggactggatg ctcccttccg
361 gaatccaaga gttcaccagg ctgcttctct aatggacgat gatcctcttc ctctgacgt
421 ctctccctgg cagcaccag atgcagacag cctgtatgta gagaagattg acgtggggga
481 agctgaacca cggactgtgg tgagcggcct ggtacagttc gtgcccaagg aggaactgca
541 ggacaggctg gtagtgggct tgtgcaacct gaaaccccag aagatgagag gactcgagtc
601 ccaaggcatg cttctgtgtg ctctatgtg agtggaggact tggagtgggg cacaggacct
661 ggggaggcca ggaagagtag ggaatcagcc catatgatgt ccttccacac accagggtga
721 agctctgaga acacgtgect cttccttgtc gatgccaaaa gttgatgcat gaaggactta
781 tcgtacaagt actgttaatg aagcatttta cctacagtta attttgtaa aatagaaatg
841 gagggctcaa accagtacat acccaagtct tactactagt aaggagtgga gcagggattc
901 aatcccagt tttgatgtct ataaagtctt cgctacgtta tttatactt cctcccctag
961 aacacagat tttggtatct tgacacacaa ttttggata gcctgggtta atgtaacct
1021 ggtgatatgc agggatgtag caagataaga ggacctctg gggctctggt actgaggatg
1081 ccctaaatcc catcagggcc cctgtgtaaa ggcccggatt gctttggcct ccacagtcac
1141 tggaaacctat ccatagcttc actcttctct tgctctgtgt cttcccagag aagggataaa
1201 ccgccagggt gaacctctgg accctccggc aggctctgct cctggtgagc acgtgtttgt
1261 gaagggctat gaaaagggcc aaccagatga ggagctcaag cccaagagga aagtcttoga
1321 gaagttgcag gctgacttca aaatttctga ggagtgcac gcacagtgga agcaaaccaa
1381 cttcatgacc aagctgggct ccatttctctg taaatcgtctg aaagggggga acattagcta
1441 gccagcccag catcttcccc ccttcttcca ccactgagtc atctgctgtc tcttcagtct
1501 gctccacca tcaccattt acccatctct caggacacgg aagcagcggg tttggactct
1561 ttattcgggtg cagaactcgg caaggggcag cttaccctcc ccagaacca ggatcatcct
1621 gtctggctgc agtgagagac caaccctaa caagggctgg gccacagcag ggagtccagc
1681 cctaccttct tcccttgga gctggagaaa tctggtttca atataactca tttaaaaatt
1741 tatgccacag tccttataat tggaaaaata ctggtgocca ggttttcttg gagttatcca
1801 agcagctgcg ccctagctg ggatctggta cctggactag gctaattaca gcttctcccc
1861 aacaggaaac tgtgggattt gaaaaggaaa gggaaaggaa aacagagaac ctagtggctt
1921 accaagtggt tggcaacttt cccaatgtct gcttactctg aggcctggca ctgggggcca
1981 gggcctgccc cagggctcct ggaatttccc ttgatccagc taggctggga cactccctaa
2041 atcagctgcg tgttgtagc atcaggcaga atgaatggca gagagtgatt ctgtcttcat
2101 agaggggtggg gtacttctcc ataaggcatc tcagtcaaat ccccatcact gtcataaatt
2161 caaataaaat gtctgaac (SEQ ID NO:7)

```

*FIG. 8*



## ADNc que codifica SP2

1 atgggggacg ctcccagccc tgaagagaaa ctgcacctta tcacccggaa cctgcaggag  
 61 gttctggggg aagagaagct gaaggagata ctgaaggagc ggaacttaa aattactgg  
 121 ggaacggcaa ccacgggcaa accacatgtg gcttactttg tgcccatgtc aaagattgca  
 181 gacttcttaa aggcaggggtg tgaggtaaaca attctgtttg cggacctcca cgcatacctg  
 241 gataacatga agccccatg ggaacttcta gaactccgag tcagttacta tgagaatgtg  
 301 atcaaagcaa tgctggagag cattggtgtg cccttggaga agctcaagtt catcaaagc  
 361 actgattacc agctcagcaa agagtacaca ctagatgtgt acagactctc ctccgtggtc  
 421 acacagcacg attccaagaa ggctggagct gaggtggtaa agcagggtga gcaccctttg  
 481 ctgagtggcc tcttataccc cggactgcag gctttggatg aagagtattt aaaagtagat  
 541 gcccaatttg gggcattga tcagagaaa atttcacct ttgcagagaa gtacctccct  
 601 gcacttggtt attcaaacg ggtccatctg atgaatccta tggttccagg ataacagc  
 661 agcaaaatga gctcttcaga agaggagtcc aagattgata tccttgatcg gaaggaggat  
 721 gtgaagaaa aactgaagaa ggccttctgt gagccaggaa atgtggagaa caatgggggt  
 781 ctgtccttca tcaagcatgt ccttttccc ctttaagtccg agtttgtgat cctacgagat  
 841 gagaaatggg gtggaacaa aacctacaca gcttacgtgg acctggaaaa ggactttgct  
 901 gctgaggttg tacatcctgg agacctgaag aattctgttg aagtcgact gaacaagtgt  
 961 ctggatccaa tccgggaaa gttaataacc cctgcccctga aaaaactggc cagcgtgccc  
 1021 taccagatc cctcaaagca gaagccaatg gccaaaagcc tgccaagaat tcagaaccag  
 1081 aggaggtcat cccatccccg ctggatatcc gtgtggggaa atcatcact gtggagaagc  
 1141 acccagatgc agacagcctg tatgtag (SEQ ID NO:9)

FIG. 10

ES 2 622 444 T3

SP3

```
      10          20          30          40          50
MNPMPVPLTG SKMSSSEES KIDLLDRKED VKKKLKKAFC EPGNVENNGV

      60          70          80          90          100
LSFIKHVLFV LKSEFVILRD EKWGGNKTYT AYVDLEKDFV AEVVHPGDLK

      110         120         130         140         150
NSVEVALNKL LDPIREKFNT PALKKLASAA YPDPSKQKPM AKGPAKNSEP

      160         170         180         190         200
EEVIPSRLDI RVGKIITVEK HPDADSLYVE KIDVGAEPR TVVSGLVQFV

      210         220         230         240         250
PKEELQDRLV VVLCNLKPQK MRGVESQGML LCASIEGINR QVEPLDPPAG

      260         270         280         290         300
SAPGEHVFVK GYEKGQPDEE LKPKKKVFEK LQADFKISEE CIAQWKQTNF

      310
MTKLGSISCK SLKGGNIS (SEQ ID NO:10)
```

*FIG. 11*

ADNc que codifica SP3

1 gaaagattht cacctttgca gagaagtacc tcctgtcact tggctattca aaacgggtcc  
 61 atctgatgaa tcctatggtt ccaggattaa caggcagcaa aatgagctct tcagaagagg  
 121 agtccaagat tgatctcctt gatcgggaagg aggatgtgaa gaaaaaactg aagaaggcct  
 181 tctgtgagcc aggaaatgtg gagaacaatg gggttctgtc ctctcatcaag catgtccttt  
 241 ttccccitaa gtccgagttt gtgacctac gagatgagaa atgggggtgga acaaaaacct  
 301 acacagctta cgtggacctg gaaaaggact ttgctgtgga ggtgtacat cctggagacc  
 361 tgaagaattc tgttgaagtc gcaactgaaca agttgtctgga tccaatccgg gaaaagttht  
 421 ataccctgc cctgaaaaaa ctggccagcg ctgcctacc agatccctca agcagaagc  
 481 caatggccaa aggcctctgc aagaattcag aaccagagga ggtcatccca tcccggctgg  
 541 atatccgtg tgggaaaatc atcaactgtg agaagcacc agatgcagac agcctgtatg  
 601 tagagaagat tgacgtgggg gaagctgaac cacggactgt ggtgagcggc ctggtacagt  
 661 tctgtcccaa ggaggaaactg caggacaggg tggtagtggg gctgtgcaac ctgaaaaccc  
 721 agaagatgag aggagtcgag tcccaaggca tgcttctgtg tgcttctata gaagggataa  
 781 accgccaggt tgaacctctg gacctccgg caggctctgc tctggtgag cacgtgtttg  
 841 tgaagggcta tgaaaagggc caaccagatg aggagctcaa gcccagaag aagttcttcg  
 901 agaagttgca gctgacttc aaaatttctg aggagtgcac cgcacagtg agcacaacca  
 961 acttcatgac caagctgggc tcaatttctt gtaaatcgtt gaaagggggg aacattagct  
 1021 agccagccca gcattcttcc ccttcttcc accactgagt catctgctgt ctcttcagtc  
 1081 tgcctccatc atcaaccatt taccatctc tcaggacaag gaagcagcgg gtttgactc  
 1141 tttattcggg gcagaactcg gcaaggggca gcttaccctc cccagaaccc aggatcatcc  
 1201 tgtctggctg cagtgagaga ccaaccctc acaagggctg gcccacagca gggagtccag  
 1261 cctaccctc ttcccctggc agctggagaa atctggtttc aatataact atttaaaaat  
 1321 ttatgccaca gtccttataa ttggaaaaat actgggtccc aggtttctt ggagttatcc  
 1381 aagcagctgc gccctagct gggatctggt acctggacta ggctaatcag agcttctccc  
 1441 caacaggaaa ctgtgggatt tgaaaaggaa agggaaaggaa aaacagagaa cctagtggtc  
 1501 taccaaagtg ttggcaactt tcccaatgct tgcttactct gaggcttggc actggggggc  
 1561 agggcctgc ccagggtccc tggaatttcc ctgatccag ctaggctggg acactcccta  
 1621 aatcagctgc gtgtgttag catcagggcag aatgaatggc agagagtgat tctgtcttca  
 1681 tagaggggtg ggtacttctc cataagggat ctcaagcaca tcccacatcac tgtcat  
 (SEQ ID NO:11)

FIG. 12

ES 2 622 444 T3

SP4

1            11            21            31            41            51  
M AKGPAKNSEP EEVIPSRLDI RVGKIITVEK HPDADSLYVE KIDVGEAEPR  
  
             61            71            81            91            101  
TVVSGLVQFV PKEELQDRLV VVLCNLKPQK MRGVESQGML LCASIEGINR  
  
             111            121            131            141            151  
QVEPLDPPAG SAPGEHVFEK GYEKGQPDEE LKPKKKVFEK LQADFKISEE  
  
             161            171  
CIAQWKQTNF MTKLGSISCK SLKGGNIS (SEQ ID NO:12)

*FIG. 13*

## ADNc que codifica SP4

1 atgggggacg ctcccagccc tgaagagaaa ctgcacctta tcacccggaa cctgcaggag  
 61 gttctggggg aagagaagct gaaggagata ctgaaggagc gggaacttaa aatttactgg  
 121 ggaacggcaa ccacgggcaa accacatgtg gcttactttg tgcccatgtc aaagattgca  
 181 gacttcttaa aggcagggtg tgaggtaaca attctgtttg cggacctcca cgcataacctg  
 241 gataacatga aagccccatg ggaacttcta gaactccgag tcagttacta tgagaatgtg  
 301 atcaaagcaa tgctggagag cattggtgtg ccctggaga agctcaagtt catcaaaaggc  
 361 actgattacc agctcagcaa agagtacaca ctagatgtgt acagactctc ctccgtggtc  
 421 acacagcacg attccaagaa ggctggagct gaggtggtaa agcagggtga gcaccctttg  
 481 ctgagtggcc tcttataccc cggactgcag gctttggatg aagagtattt aaaagtagat  
 541 gcccaatttg gaggcattga tcagagaaag atttcacct ttgcagagaa gtacctccct  
 601 gcaactggct attcaaaacg ggtccatctg atgaatccta tggttccagg attaacaggc  
 661 agcaaaatga gctcttcaga agaggagtcc aagattgatc tccttgatcg gaaggaggat  
 721 gtgaagaaaa aactgaagaa ggccttctgt gagccaggaa atgtggagaa caatgggggtt  
 781 ctgtccttca tcaagcatgt cctttttccc cttaagtccg agtttgtgat cctacgagat  
 841 gagaaatggg gtggaacaaa aacctacaca gcttacgtgg acctggaaaa ggactttgct  
 901 gctgagggtt tacatcctgg agacctgaag aattctgttg aagtcgcact gaacaagtgtg  
 961 ctggatccaa tccgggaaaa gtttaatacc cctgcccctga aaaaactggc cagcgtgccc  
 1021 taccagatc cctcaaagca gaagccaatg gccaaaaggc tgccaagaat tcagaaccag  
 1081 aggaggtcat cccatccccg ctggatatcc gtgtggggaa aatcatcact gtggagaagc  
 1141 acccagatgc agacagcctg tatgtag (SEQ ID NO:13)

FIG. 14

ES 2 622 444 T3

SP5

```
      10      20      30      40      50
XXXXXXXXPM AKGPAKNSEP EEVIPSRLDI RVGKIITVEK HPDADSLYVE

      60      70      80      90     100
KIDVGEAEPR TVVSGLVQFV PKEELQDRLV VVLCNLKPQK MRGVESQGML

     110     120     130     140     150
LCASIEGINR QVEPLDPPAG SAPGEHV FVK GYEKGQPDEE LKPKKKVFEK

     160     170     180
LQADFKISEE CIAQWKQTNF MTKLGSISCK SLKGGNIS (SEQ ID NO:14)
```

*FIG. 15*

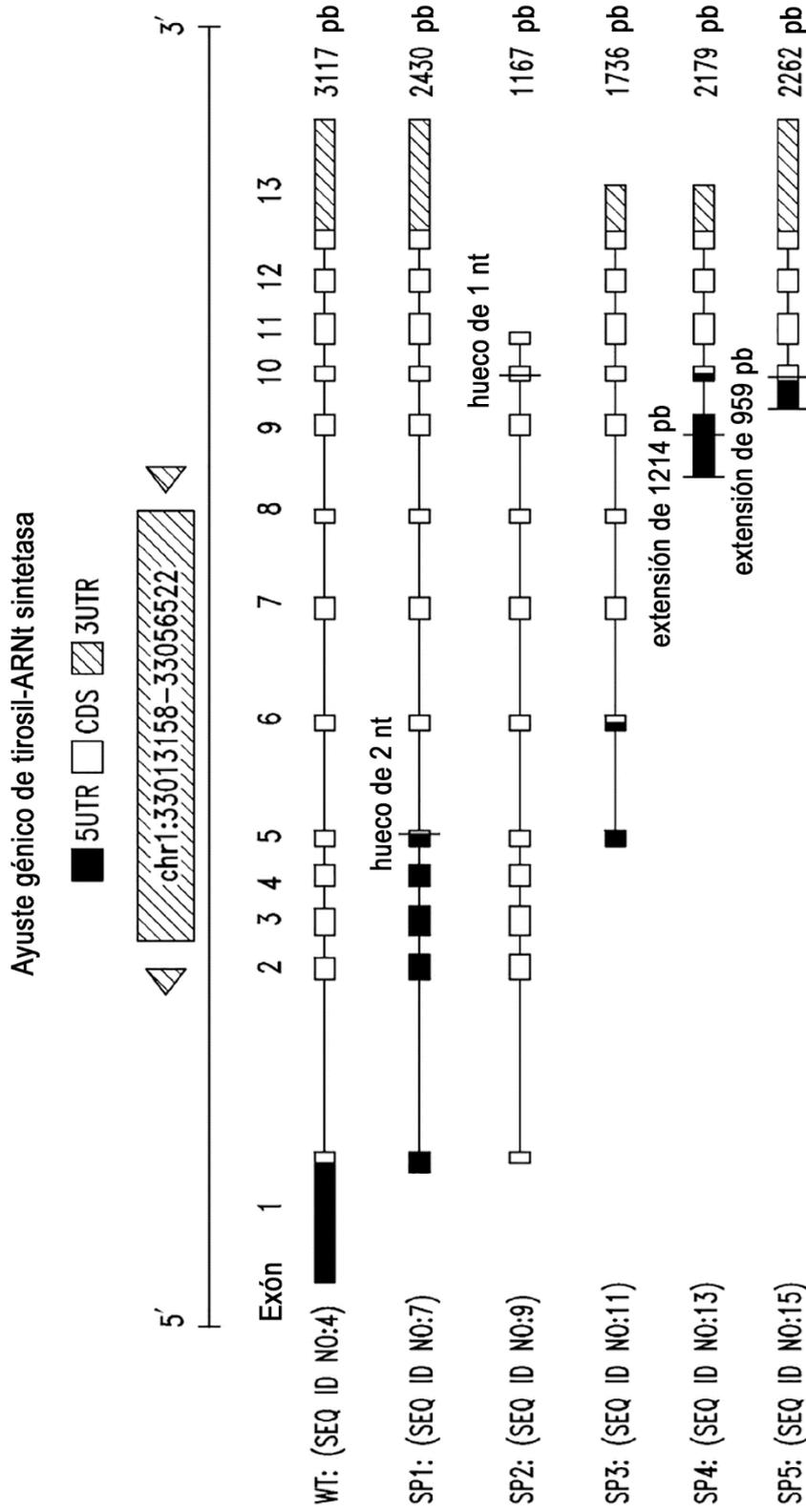
ADNc que codifica SP5

```

1 gccagacaca gtggetcaca cctgtaatct taacactttg gaaggctgag gcaggcggat
61 cacttgagcc caaaagttag agacaaaaac ccagtctcta cccaaaaaaaa aaaaaaaaaa
121 aaaaattagc caggcatagt agcacatgcc tgtagtccca gctacttggg aggctgagggt
181 gagaggatca cctgagcatg gggaaagttga gactgcagtg agccatgatc gcaccactgc
241 actccagcct gggcaacaga gtgagactct atgtctcaa aaaagaaaaa tgatagaaat
301 tagattagac ctattatacc caaccgggat atagggtatc gatagtttct tacacagctg
361 ttgggcagag cctgcagagc ttagagaagc ttatctttag attctccag tttccttcta
421 tgtgcatggg cctggctctt agttggccat ccacttgtgc gtaatgctaa gatattggca
481 ttgatagctt tgtgcgacc ttccagaaaa aaactcagta actcagtaaa atttttttt
541 ttttttctaa aagagacaga gtctggctct gttgccagc ctggctctga agtctgggc
601 ttaagcaatc ctcccgtctc agcctcccaa agtgctagaa ttacaggtgt gagctaccac
661 acctggccaa gactcagtaa attctatgtg gaatgcatga atggaaatac ctaaaggagg
721 caaagctact actgctccct ccccgctagt ctaataattg agggagagaa cagatgaaaa
781 tcaggatagt catgtctgaa aggttgccaa cccagtatta aagaagttac aactcagtg
841 ttagactctg gggattctac actaaatctt acctaatctc agtgtcttaa cgtgggtggga
901 tcagcagctg acctgccaca gggagaat ctacctcatg gggttcttct cattcccaga
961 gccaatggcc aaaggccctg ccaagaatc agaaccagag gagtccctcc ccagatgcag
1021 ggatatccgt gtggggaaaa tcatcactgt ggagaagcac ccagatgcag acagcctgta
1081 tgtagagaag attgacgtgg gggaaagctga accacggact gtggtgagcg gcctggtaca
1141 gttcgtgccc aaggaggaac tgcaggacag gctggtagt gtgctgtgca acctgaaacc
1201 ccagaagatg agaggagtgc agtcccagg catgcttctg tgtcttcta tagaagggat
1261 aaaccgccag gttgaacctc tggacctcc ggcaggctct gctcctggtg agcacgtgtt
1321 tgtgaagggc tatgaaaagg gccaaaccaga tgaggagctc aagccaaga agaaagtctt
1381 cgagaagttg caggctgact tcaaaatctc tgaggagtgc atgcacagt ggaagcaaac
1441 caacttcatg accaagctgg gctccatttc ctgtaaactg ctgaaagggg ggaacattag
1501 ctagccagcc cagcatcttc cccccttctt ccaccactga gtcactctgt gtctcttcag
1561 tctgctccat ccatcaccca tttaccctc tctcaggaca cgaagcagc gggtttgga
1621 tctttattcg gtgcagaact cggcaagggg cagcttacc tcccagaac ccaggatcat
1681 cctgtctggc tgcagtgaga gaccaacccc taacaagggc tggccacag cagggagtcc
1741 agccctacct tcttcccttg gcagctggag aaatctggt tcaatataac tcatttaaaa
1801 atttatgcca cagtcttat aattggaaaa atactggtgc ccaggttttc ttggagttat
1861 ccaagcagct gcgcccctag ctgggatctg gtacctggac taggctaatt acagcttctc
1921 cccaacagga aactgtggga tttgaaaagg aaagggagg gaaaacagag aacctagtgg
1981 tctaccaagt ggttggcaac tttcccactg tctgcttact ctgaggcttg gcactggggg
2041 ccagggcctg cccagggct cctggaattt cccttgatcc agctaggctg ggacactccc
2101 taaatcagct gcgtgttggt agcatcaggc agaatgaat gcagagagtg attctgtctt
2161 catagagggt ggggtacttc tccataaggc atctcagtca aatccccatc actgtcataa
2221 attcaaataa aatgtctgaa caagggaaaa aaaaaaaaaa aa (SEQ ID NO:15)

```

*FIG. 16*



*FIG. 17*

Variante	NCBI	Anotación	Diferencia de ARNm de referencia	Predicción de ORF del NCBI
SP1 (SEQ ID NO: 7)	<u>AK026635</u>	ADNc de Homo sapiens: FLJ22882 fis, clon KAT03597, muy similar a tirosil-ARNt sintetasa humana HSU89436 Mma. carcinoma de células en anillo de sello ARNm de tirosil-ARNt sintetasa humana, cds completa	Omitida parte del exón 1, hueco de 2 nt en exón 5	348 aa
SP2 (SEQ ID NO: 9)	<u>HSU40714</u>	ARNm de tirosil-ARNt sintetasa humana, cds completa	Omitidos los exones 12&13 y parte de los exones 1&11, hueco de 1 nt en el exón 10	388 aa (descrito)
SP3 (SEQ ID NO: 11)	<u>CR628320</u>	DNAc de longitud completa clon CS0DI068YE17 de cot. de placenta 25-niornormalizado	Omitidos exones 1-4, sin huecos	318 aa
SP4 (SEQ ID NO: 13)	<u>AK127182</u>	ADNc de Homo sapiens FLJ45247 fis, clon BRCC02016661, muy similar a tirosil-ARNt sintetasa de cuerpo calloso (cerebro)	Omitidos exones 1-8, 1214 pb de extensión de intrón 8-9 antes del exón 9, sin huecos	179 aa
SP5 (SEQ ID NO: 15)	<u>BC35242</u>	Tirosil-ARNt sintetasa humana. ARNm de testículo (ADNC clon IMAGE: 4837840), con aparente intrón retenido	Omitidos exones 1-9 959 pb de extensión de intrón 9-10 antes del exón 10, sin huecos	188 aa

FIG. 18

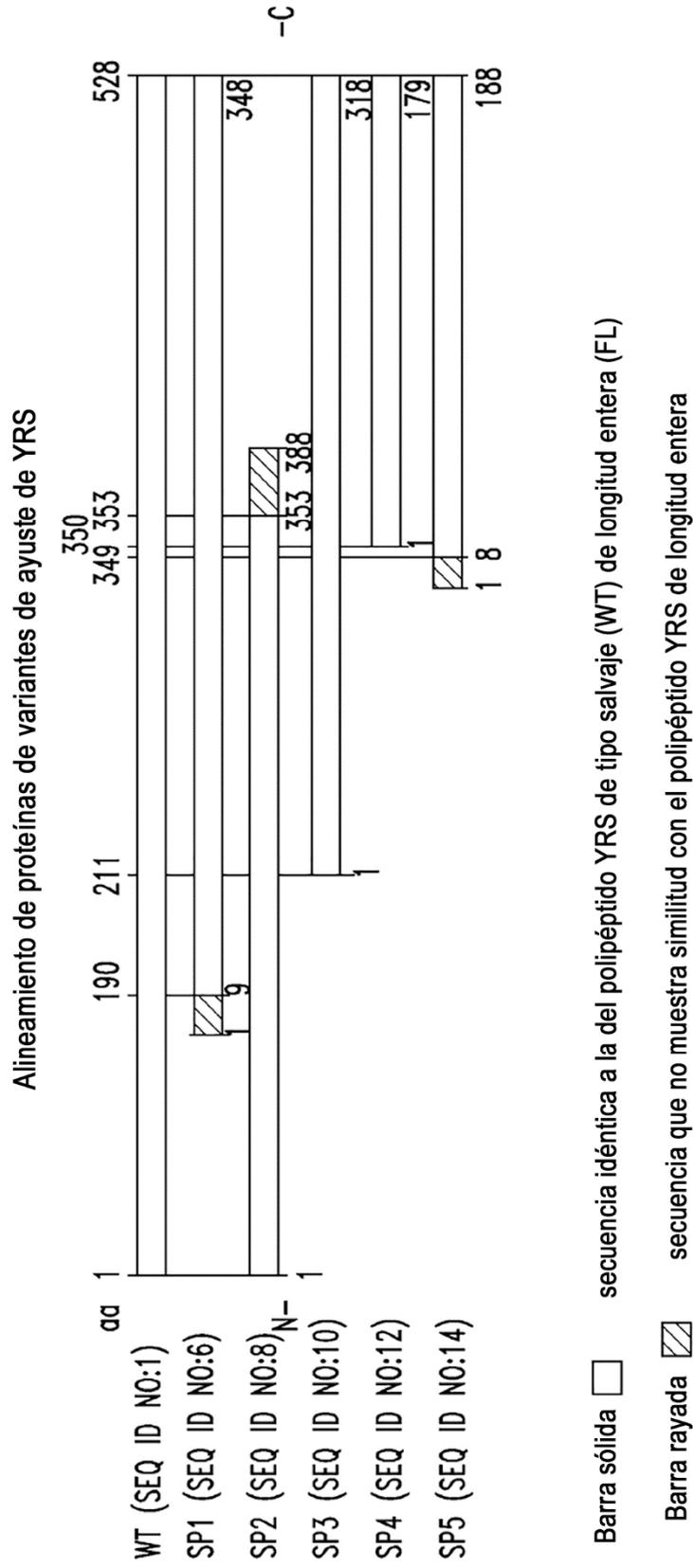


FIG. 19

Actividad trombotrombopoyética de polipéptidos tirosil-ARNT sintetasa en ratas

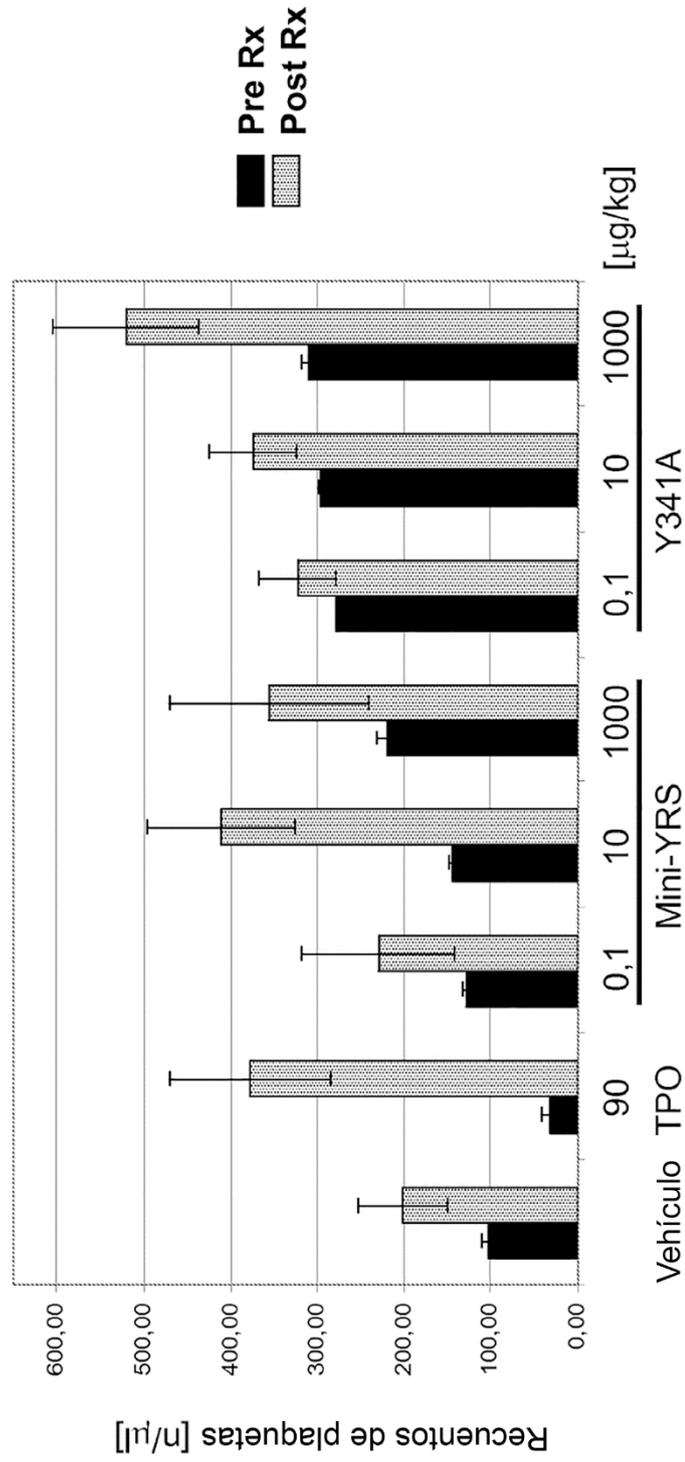
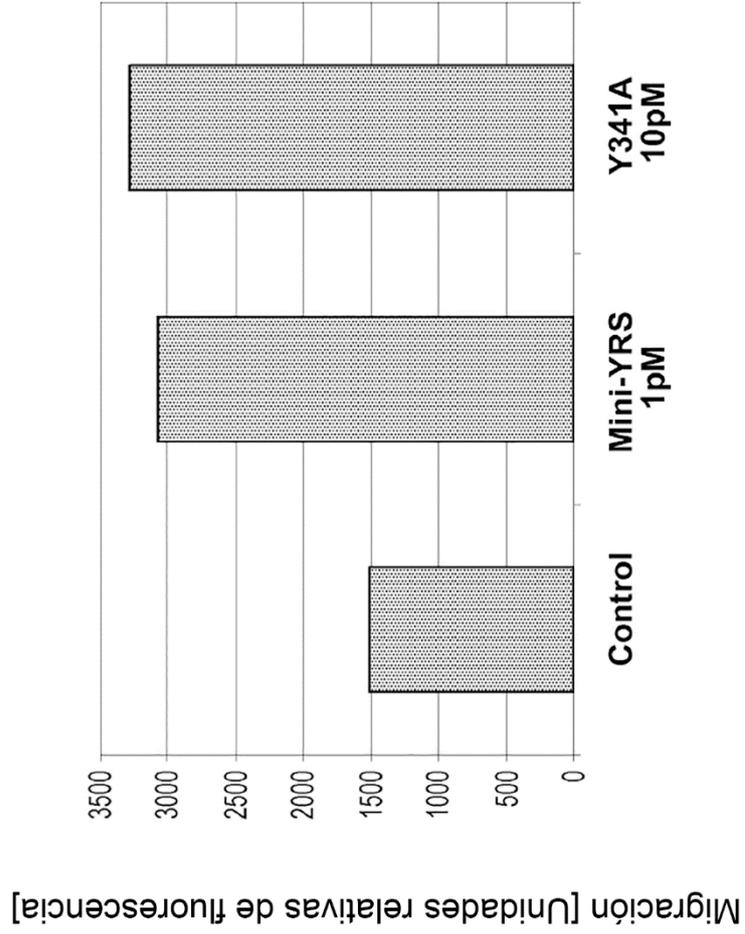


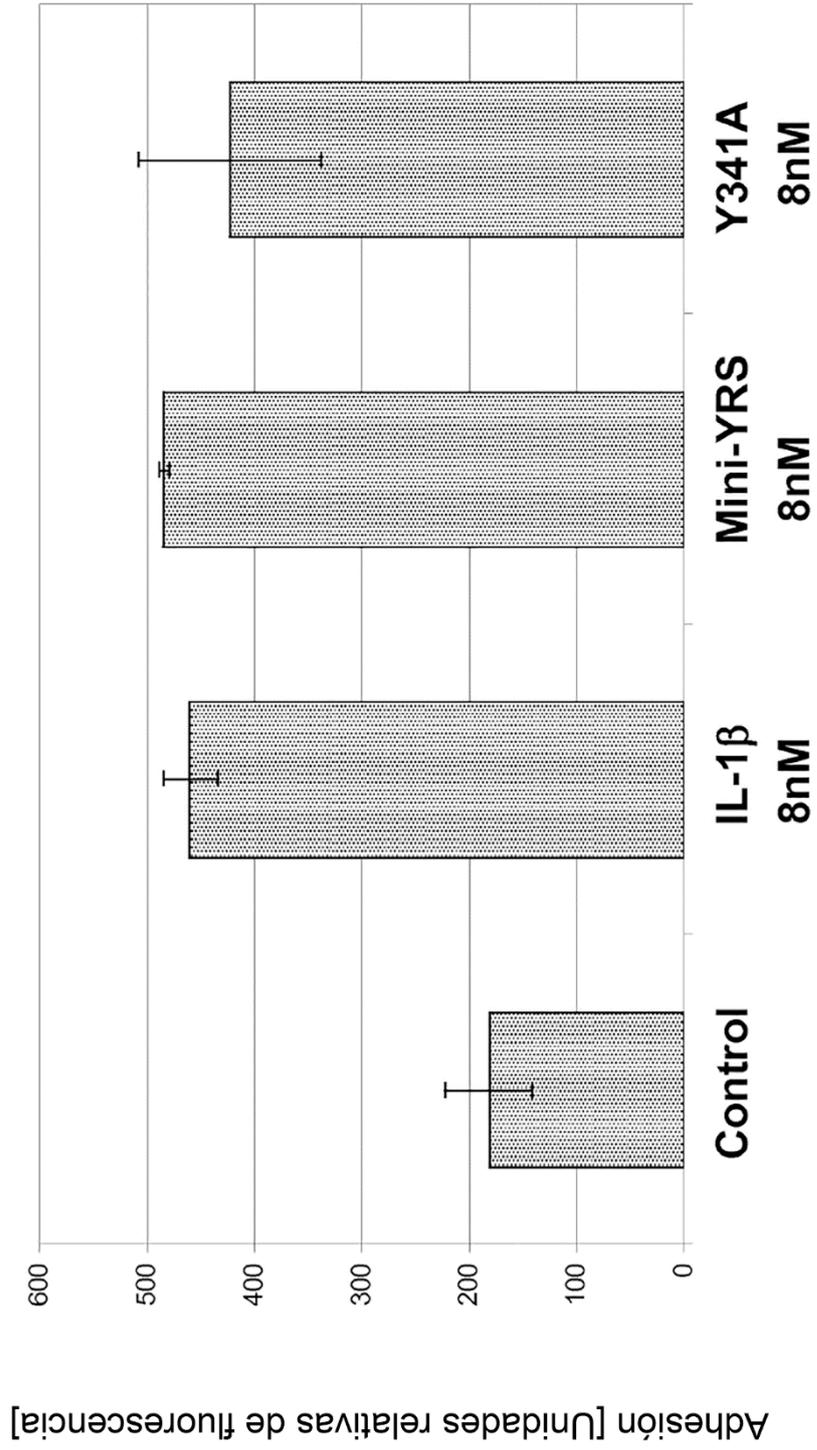
FIG. 20

Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa son  
quimioatrayentes para megacarioblastos MO7e



*FIG. 21*

**Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa fomentan la adhesión celular a monocapa endotelial**



*FIG. 22*

Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa estimulan la expresión de VCAM-1 en monocapas endoteliales

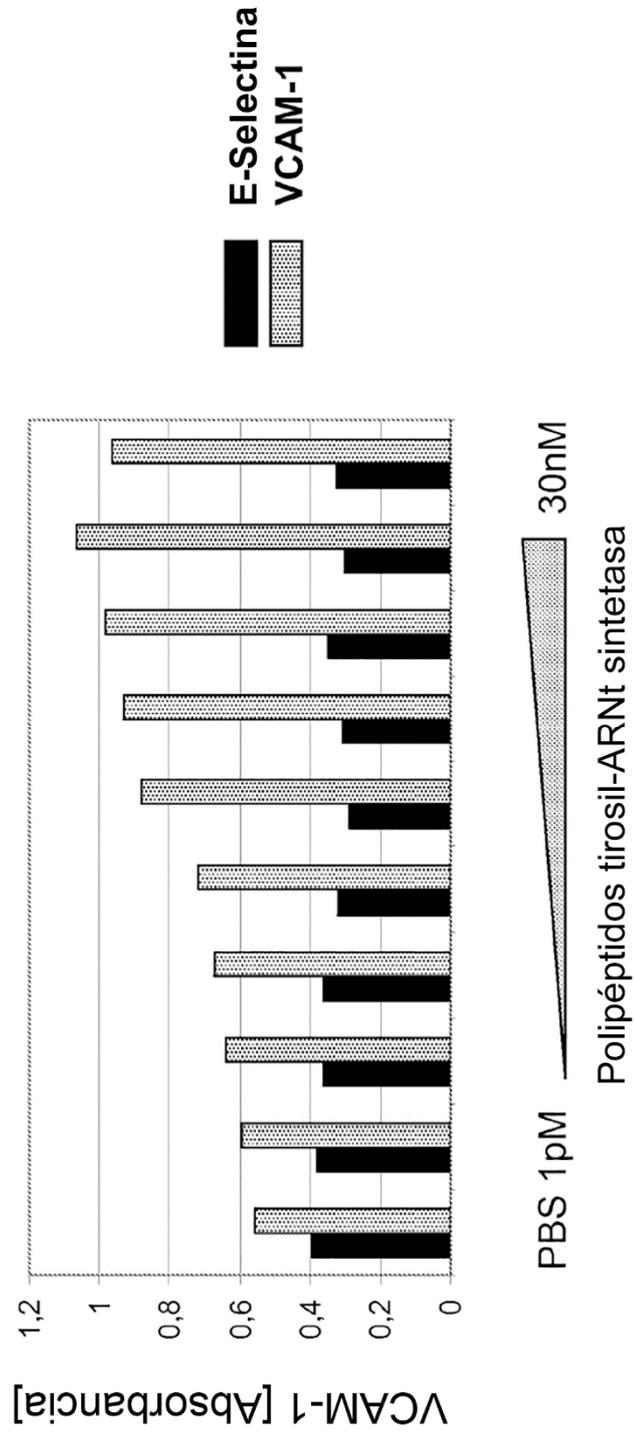
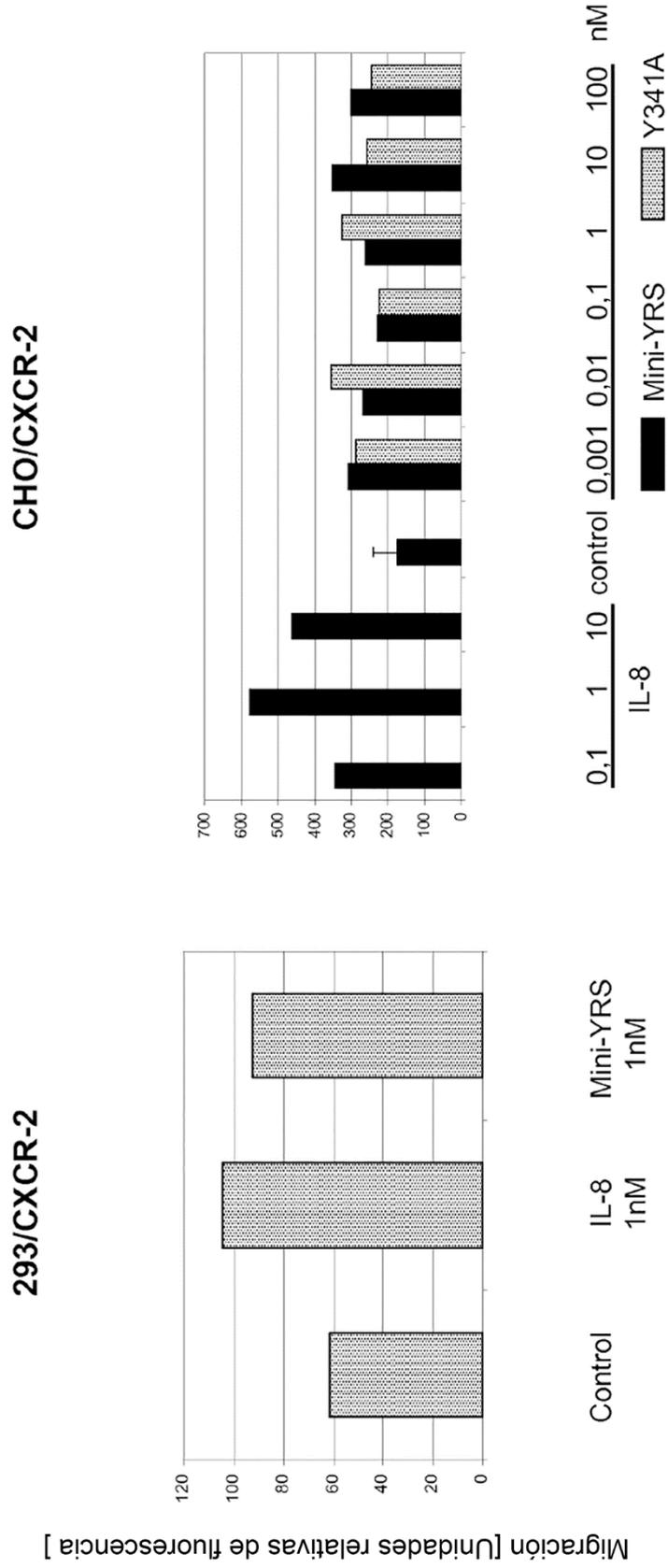


FIG. 23

**Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa estimulan la migración de líneas de células 293 y CHO con el receptor CXCR-2**



*FIG. 24*

Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa estimulan la migración de células polimorfonucleares (PMN)

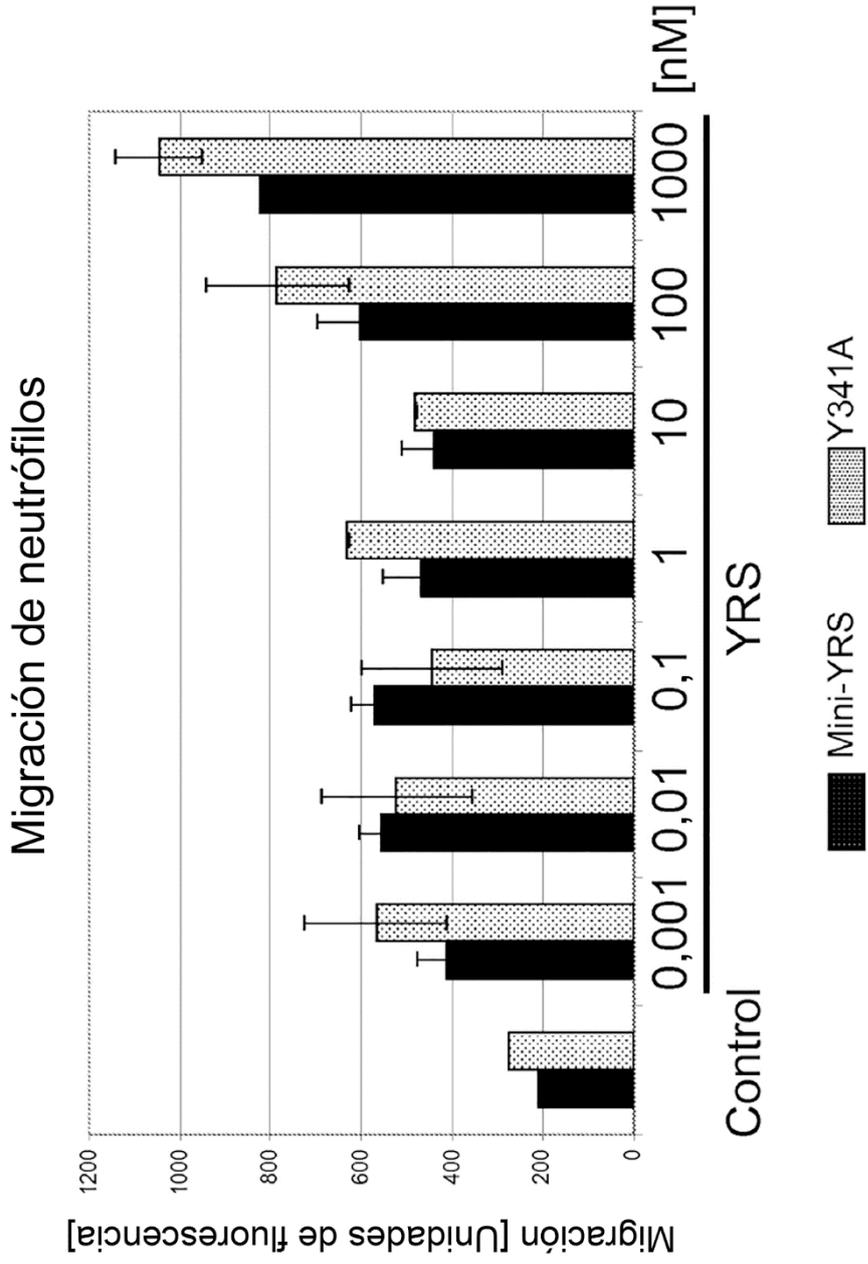


FIG. 25

Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa afectan células progenitoras de megacariocitos

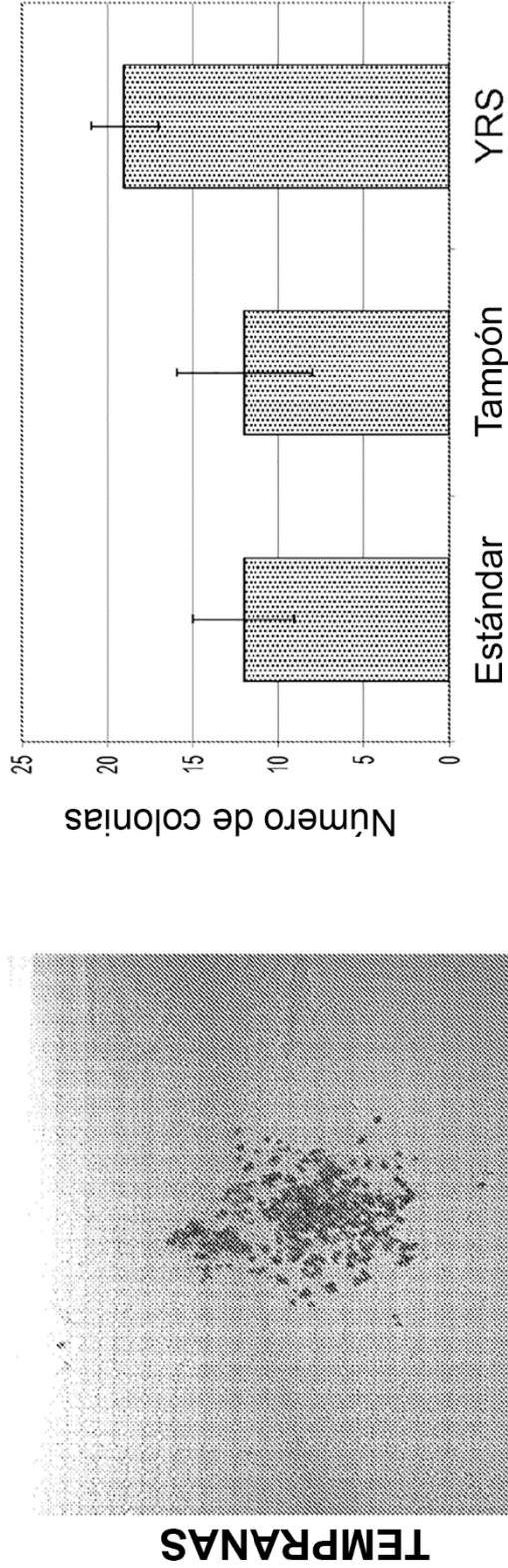


FIG. 26A

Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa afectan células progenitoras de megacariocitos

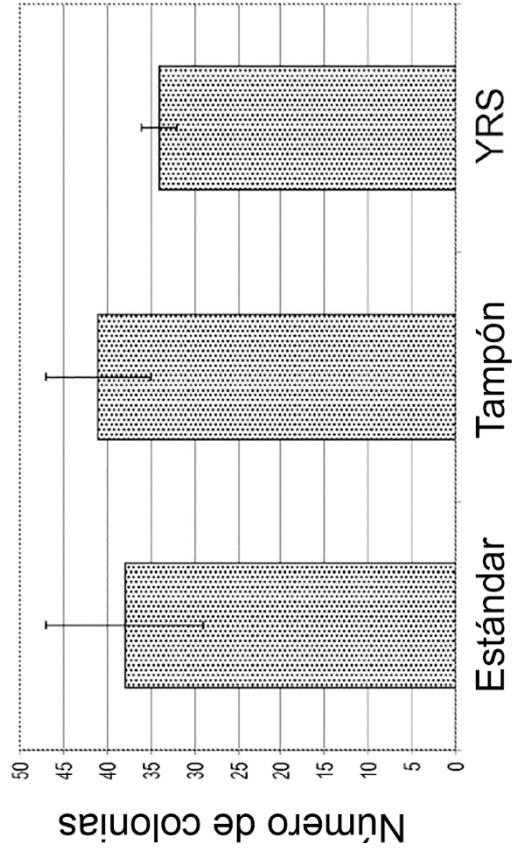
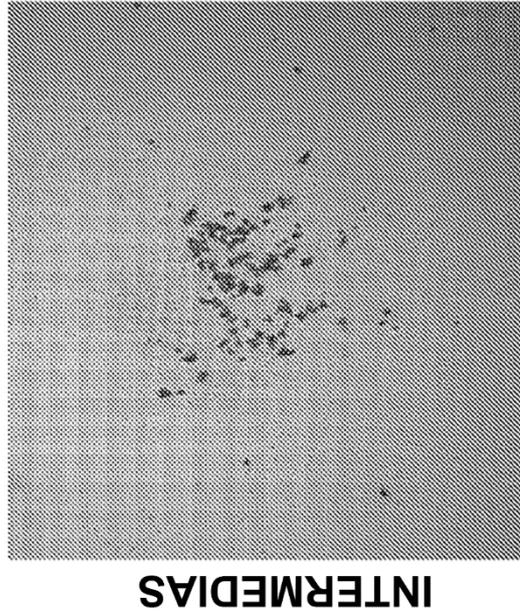


FIG. 26B

Los polipéptidos tirosil-ARNt sintetasa afectan células progenitoras de megacariocitos

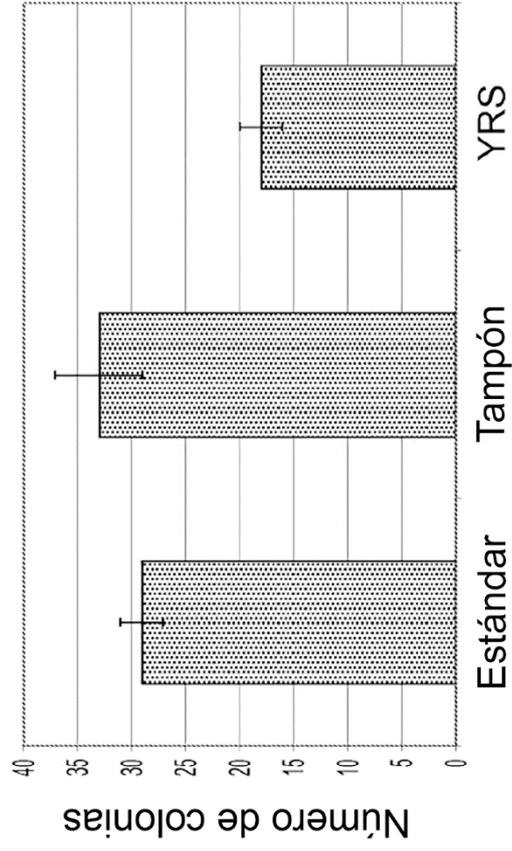
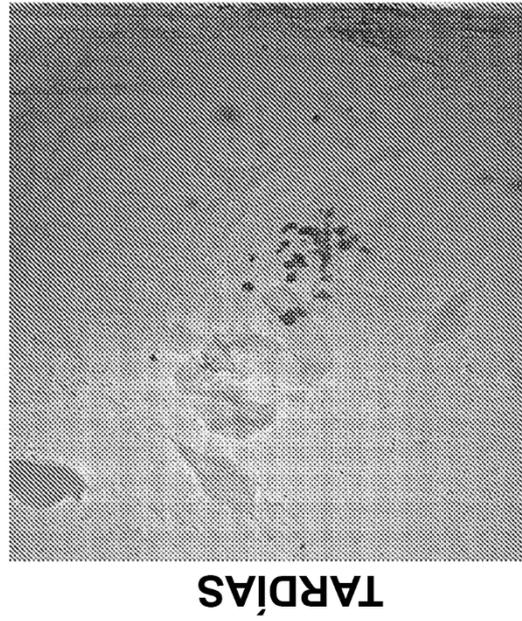


FIG. 26C