

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 503**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2003 E 10011810 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **17.06.2020 EP 2311869**

54 Título: **Uso de reactivos relacionados con citocinas de mamíferos**

30 Prioridad:

01.02.2002 US 353509 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
08.04.2021

73 Titular/es:

**MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)
126 East Lincoln Avenue
Rahway, NJ 07065-0907, US**

72 Inventor/es:

**DE WAAL MALEFYT, RENE;
LIU, YONG-YUN;
NAGALAKSHMI, MAREHALLI L.;
WATANABE, NORIHIKO;
SOUHELIS, VASSILI y
YUAN, WEI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

DESCRIPCIÓN

Uso de reactivos relacionados con citocinas de mamíferos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a usos de citocinas de mamíferos. Más específicamente, la invención se refiere a la identificación de citocinas de mamíferos e inhibidores de las mismas que afectan a afecciones médicas tales como alergia e inflamación.

10 Antecedentes de la invención

Durante algún tiempo se ha sabido que la respuesta inmunitaria de mamíferos se basa en una serie de interacciones celulares complejas denominadas la "red inmunitaria". Reciente investigación ha proporcionado nuevos conocimientos en los funcionamientos internos de esta red. Aunque sigue estando claro que gran parte de la respuesta gira, de hecho, alrededor de las interacciones de tipo red de los linfocitos, macrófagos, granulocitos y otras células, actualmente los inmunólogos son de la opinión general de que las proteínas solubles, conocidas como citocinas, desempeñan un papel crucial en el control de estas interacciones celulares. Por tanto, existe un considerable interés en el aislamiento, caracterización y mecanismos de acción de los factores moduladores celulares y cuyos conocimientos conducirán a significativos avances en el diagnóstico y terapia de numerosas anomalías médicas, por ejemplo trastornos del sistema inmunitario. Algunos de estos factores son factores de crecimiento y/o diferenciación hematopoyética, por ejemplo el factor de células madre (SCF) y la IL-7. Véase, por ejemplo, Mire-Sluis y Thorpe (1998) Cytokines, Academic Press, San Diego, CA; Thomson (ed. 1998) The Cytokine Handbook. 3ª ed., Academic Press, San Diego, CA; Metcalf y Nicola (1995) The Hematopoietic Colony Stimulating Factors, Cambridge Univ. Press; and Aggarwal and Gutterman (1991) Human Cytokines, Blackwell Publishing, Malden, MA.

Las citocinas median en las actividades celulares de varios modos: Las citocinas soportan la proliferación, el crecimiento y la diferenciación de las células madre hematopoyéticas pluripotenciales en un gran número de progenitores, que comprende diversos linajes celulares formando un complejo sistema inmunitario. Las interacciones adecuadas y equilibradas entre los componentes celulares son necesarias para una respuesta inmunitaria sana. Los diferentes linajes celulares a menudo responden de un modo diferente cuando las citocinas se administran junto con otros agentes.

Las citocinas median la comunicación entre las células del sistema inmunitario, por ejemplo células presentadoras de antígeno (CPA) y los linfocitos T. Las células dendríticas (CD) son las más potentes de las células presentadoras de antígeno. Véase, por ejemplo, Paul (ed.) (1993) Fundamental Immunology. 3a ed., Raven Press, NY. La presentación del antígeno se refiere a los acontecimientos celulares en los que se capta un antígeno proteínico, procesado por las células presentadoras de antígeno (CPA) y, después, reconocido para iniciar una respuesta inmunitaria. Las células presentadoras de antígeno más activas se han caracterizado como los macrófagos (que son productos de desarrollo directos de los monocitos), células dendríticas y ciertos linfocitos B. Las CD son muy respondedoras a estímulos inflamatorios tales como lipopolisacáridos bacterianos (LPS) y citocinas tales como el factor alfa de necrosis tumoral (TNF-alfa). Las citocinas o estímulos, tales como LPS, pueden inducir una serie de cambios fenotípicos y funcionales en las CD que en conjunto se denominan maduración. Véase, por ejemplo Banchemreau y Schmitt (eds.) (1995) Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology, Plenum Press, NY.

Las células dendríticas se pueden clasificar como, por ejemplo, células dendríticas intersticiales del corazón, el riñón, los intestinos y los pulmones; las células de Langerhans en la piel y las membranas mucosas; las células dendríticas interdigitantes en la médula mímica y el tejido linfático secundario; y la sangre y las células dendríticas linfáticas. Aunque las células dendríticas en cada uno de estos compartimentos son leucocitos CD45+ que aparentemente surgen de la médula ósea, pueden exhibir diferencias que se relacionan con el estado de maduración y el microambiente. Los cambios de maduración en las CD incluyen, por ejemplo, silenciamiento de la captación de antígeno por endocitosis, regulación por incremento de las moléculas de superficie relacionadas con la activación de las células T y producción activa de una serie de citocinas, incluidas TNF-alfa e IL-2. Tras la acumulación local de TNF-alfa, las CD migran a las áreas de los linfocitos T de órganos linfoides secundarios para activar las células T específicas de antígeno.

Las citocinas y las células inmunitarias median los mecanismos o vías fisiológicas específicos, por ejemplo vías que conducen a los diversos trastornos inflamatorios. Aproximadamente el 20 % de la población de los países occidentales sufre trastornos inflamatorios, por ejemplo las enfermedades alérgicas que incluyen asma, rinitis, dermatitis atópica y alergias alimentarias (véase, por ejemplo, A. B. Kay (2001) N. Engl. J. Med. 344:30-37). La inflamación alérgica es el resultado de una compleja cascada inmunológica que hace que los linfocitos T produzcan citocinas derivadas de TH2 con regulación alterada, tales como IL-4, IL-5 e IL-13, de modo que estas citocinas desencadenan hiperreactividad bronquial, producción de IgE, eosinofilia, y producción de moco (véase, por ejemplo, Busse y Lemanske, Jr. (2001) N. Engl. J. Med. 344:350-62; Holgate (2000) Br. Med. J. 320:231-234; y Renauld (2001) J. Clin. Pathol. 54:577-589).

- La inflamación y la reconstitución inmunitaria son dos situaciones en las que es deseable usar intervención farmacéutica o terapéutica para modular la actividad o la proliferación de los linfocitos, por ejemplo modulando interacciones entre las CPA y los linfocitos T. Las afecciones inflamatorias dependientes de las interacciones entre las CPA-T incluyen, por ejemplo, psoriasis, las alérgicas y la hipersensibilidad bronquial. La reconstitución inmunitaria, la reposición del sistema inmunitario, es útil en el tratamiento de las infecciones virales, por ejemplo VIH/SIDA, y en el tratamiento de pacientes que sufren citoablación, en la que la citoablación se efectúa con, por ejemplo, radioterapia o quimioterapia.
- La psoriasis, una enfermedad inflamatoria de la piel, tiene una prevalencia en los países occidentales de más del 4 % (Granstein (1996) *J. Clin. Inv.* 98:1695-1696; Christophers (2001) *Clin. Exp. Dermatol.* 26:314-320). La enfermedad puede producir frecuentes recaídas, en ocasiones es potencialmente mortal y con frecuencia se asocia con artritis, es decir artritis psoriásica. Los linfocitos T y los queratinocitos son necesarios para el desarrollo y la persistencia de la psoriasis (Greaves y Weinstein (1995) *New Engl. J. Med.* 332:581-588; Robert y Kupper (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1817-1828; Fearon y Veale (2001) *Clin. Exp. Dermatol.* 26:333-337). Las células dendríticas y los mastocitos, por ejemplo, también contribuyen a la inflamación psoriásica (Mrowietz, y col., (2001) *Exp. Dermatol.* 10:238-245; Ackermann, y col. (1999) *Br. J. Dermatol.* 140:624-633).
- La hiperreactividad bronquial es la manifestación de enfermedades inflamatorias pulmonares, incluidas asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC; trastorno pulmonar obstructivo crónico), bronquitis crónica, bronquitis eosinófila, bronquiolitis y bronquiolitis viral (Riffo-Vasquez and Spina (2002) *Pharmacol. Therapeutics* 94:185-211).
- El asma es una enfermedad crónica que se caracteriza por un incremento de la capacidad de respuesta bronquial y por obstrucción e inflamación de las vías respiratorias. La enfermedad representa, por ejemplo, más del 15 % de las urgencias pediátricas (Crain y col., (1995) *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 149:893-901). Las CPA, los linfocitos T, los linfocitos B, los eosinófilos, los mastocitos y los basófilos contribuyen al mecanismo del asma. Las CPA presentan el antígeno a los linfocitos T que, a su vez, hacen que los linfocitos B produzcan IgE. Los eosinófilos, los basófilos y los mastocitos liberan IL-4 que, a su vez, estimula la diferenciación de los linfocitos T en células TH2 que secretan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 tras la estimulación con el antígeno. La IL-4 y la IL-13 secretadas por las células TH2 y otras células estimulan la activación de los linfocitos B (Marone (1998) *Immunol. Today* 19:5-9). Los linfocitos B son estimulados para producir IgE por dos tipos de señales, IL-4 o IL-13, y el contacto directo con los linfocitos T (Barnes y Lemanske (2001) *New Engl. J. Med.* 344:350-362). La IgE liberada activa los mastocitos que, a su vez, producen la construcción de las vías respiratorias. Los eosinófilos producen la proteína básica principal que directamente produce daños en las vías respiratorias. La IL-5 desempeña un papel crucial en el desarrollo, supervivencia y reclutamiento de eosinófilos (Barnes y Lemanske (2001) *New Engl. J. Med.* 344:350-362). La prevención de la activación de los linfocitos T, por ejemplo con anticuerpos anti-CD4, o el bloqueo de las citocinas derivadas de TH2, por ejemplo la IL-5, se tratan como nuevos enfoques terapéuticos en el tratamiento del asma alérgica, Stirling y col., *British Med. Bull.* (2000) 56: 1037-1053).
- La EPOC, que implica infiltración linfocitaria de los bronquiolos, es la cuarta causa principal de muerte en Norteamérica (Barnes (2000) *New Engl. J. Med.* 343:269-280). La enfermedad se caracteriza por un engrosamiento del músculo liso de las vías respiratorias e inflamación de las vías respiratorias, es decir con infiltración con monocitos, macrófagos, linfocitos T CD4*, linfocitos T CD8* y neutrófilos en los pulmones (Barnes (2000) *Chest* 117:10S-14S; Jeffery (1998) *Thorax* 53:129-136).
- La reconstitución inmunitaria es un estado en el que es deseable la modulación de la proliferación de linfocitos. La reconstitución inmunitaria se consigue, por ejemplo, mediante trasplante de médula ósea. La potenciación o estimulación de la proliferación de los linfocitos T se desea en el trasplante de médula ósea tras quimioterapia y en las enfermedades que producen deficiencia inmunitaria, por ejemplo el SIDA (Pantaleo, y col., (1993) *New Engl. J. Med.* 328:327-335; Kovacs, y col., (1995) *New Engl. J. Med.* 332:567-575), así como con el uso de linfocitos T terapéuticos, incluidos los linfocitos T alterados genéticamente (Terando y Chang (2002) *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 11:621-643; Gottschalk, y col., (2002) *Adv. Cancer Res.* 84:175-201). La reconstitución inmunitaria usando trasplantes de médula ósea o trasplantes de células madre se usa tras terapia mieloablativa o inmunosupresora (Paloczi (2000) *Immunol. Lett.* 74:177-181; Ren-Heidenreich y Lum (2001) *Curr. Gene Ther.* 1:253-255).
- Los receptores de los trasplantes de células madre experimentan retrasos en la adquisición de linfocitos completamente funcionales y estos retrasos se pueden extender más allá de un año tras el trasplante. Las células no tratadas anteriormente requieren un timo competente para desarrollarse. Por tanto, los recuentos de linfocitos T CD4+ pueden ser inferiores a lo normal con los trasplantes de médula ósea, es decir, cuando el timo está dañado por radioterapia (Novitzky y Davison (2001) *Cytotherapy* 3:211-220). Por tanto, la estimulación de la proliferación de los linfocitos es un objetivo deseable por los retrasos en la proliferación de linfocitos T tras trasplante de médula ósea, así como en trasplantes en los que el timo está dañado.
- La citoablación seguida de trasplante de médula ósea o terapia con células madre se usa en el tratamiento de una serie de enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad

de Crohn y esclerosis múltiple (Breedveld (2000) *Arthritis Res.* 3:268-269; McColl, y col., (1999) *Ann. Intern. Med.* 131:507-509; Laar (2000) *Arthritis Res.* 2:270-275), así como en el tratamiento de cánceres tales como linfoma no-Hodgkin y leucemia (Kay, y col., (2002) *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)* 193-213; Hagemeister (2002) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 49 Suppl. 1:S13-20). Por tanto, existe la necesidad creciente de estimular la proliferación de linfocitos T tras citablación.

La enfermedad del injerto contra huésped (EICH) es un problema con los trasplantes de médula ósea. La EICH es una consecuencia de los trasplantes alogénicos, en los que la EICH se puede prevenir mediante la depleción ex vivo de los linfocitos T en el injerto (Andre-Schmutz, y col., (2002) *Lancet* 360:130-137; Aversa, y col., (1998) *New Engl. J. Med.* 339:1186-1193). Se describe el tratamiento ex vivo de los linfocitos, por ejemplo mediante tratamiento con citocinas o ácidos nucleicos, seguido de la introducción en el sujeto. Véase, por ejemplo, Emerudh, y col. (2002) *Curr. Med. Chem.* 9:1497-1505; Cavazzana-Calvo y col., (2002) *Semin. Hematol.* 39:32-40; Gunzer y Grabbe (2001) *Crit. Rev. Immunol.* 21:133-145; Gokmen, y col., (2001) *J. Hematother. Stem Cell Res.* 10:53-66. Sin embargo, la depleción ex vivo descrita anteriormente de los linfocitos T exacerba la deficiencia de linfocitos T. Por tanto, existe la creciente necesidad de estimular la proliferación de linfocitos T para promover la reconstitución inmunitaria, en la que los linfocitos T estaban deplecionados ex vivo, antes del injerto.

Actualmente existe el interés en el uso de factores de crecimiento hematopoyéticos y citocinas para estimular la proliferación de linfocitos T tras los trasplantes de médula ósea (Symann, y col., (1989) *Cancer Treat. Rev.* 16 Suppl. A:15-19; Lenarsky (1993) *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 15:49-55). Un problema con los métodos actuales es desviar el repertorio de los linfocitos T hacia la oligoclonalidad (Marktel, y col., (2002) *Blood*, October 3, 2002, publicación electrónica previa a la impresión). Por tanto, existe la necesidad de estimular la proliferación de linfocitos T mediante procedimientos que mantengan la policlonalidad.

La descripción proporciona procedimientos para modular las células dendríticas (CD) para el tratamiento de afecciones inflamatorias dependientes de las interacciones CPA/linfocitos T y para efectuar la reconstitución inmunitaria. Las células dendríticas, las células presentadoras de antígeno profesionales, desempeñan un papel en la estimulación de la activación y proliferación de los linfocitos T. Las CD, las células presentadoras de antígeno profesionales, desempeñan un papel importante en la patogenia de las enfermedades alérgicas. Véase, por ejemplo, Banchereau and Steinman (1998) *Nature* 392:245-252; Stumbles (1999) *Immunol. Cell Biol.* 77:428-433; Lambrecht (2001) *Clin. Exp. Allergy* 31, 206-218; Semper y col., (1995) *Adv. Exp. Med. Biol.* 378:135-138. No obstante, la señal inicial que ceba las CD para inducir la producción por los linfocitos T de las citocinas TH2 es desconocida (véase, por ejemplo, D. von Bubnoff, y col., (2001) *J. Allergy Clin. Immunol.* 108:329-339). Aunque se ha demostrado que los queratinocitos y las células epiteliales de la mucosa producen citocinas proinflamatorias, tales como IL-1, IL-6, IL-8, Gm-CSF y TNF- α tras la activación (S. Nozaki, y col., (1992) *Adv. Dermatol.* 7:83-100; y el debate 101; T. S. Kupper (1990) *J. Invest. Dermatol.* 94:146S-150S; P. F. Piguet (1992) *Springer Semin. Immunopathol.* 13:345-354; e I. R. Williams y T. S. Kupper (1996) *Life Sci.* 58:1485-1507), ninguna de estas citocinas puede explicar el mecanismo subyacente a la inducción de la inflamación alérgica (véase, por ejemplo, D. von Bubnoff, anteriormente).

La linfopoyetina estromal tímica (hTSLP/IL-50) (SEQ ID NO: 1) es una nueva citocina similar a la IL-7, clonada de una línea de células estromales tímicas (véase, por ejemplo, J. E. Sims y col., (2000) *J. Exp. Med.* 192:671-680; y el documento USSN 09/963,347, presentado el 24 de septiembre de 2001). La región de codificación madura de la TSLP humana corresponde a los aminoácidos 29-159 (Reche, y col., (2001) *J. Immunol.* 167:336-343). El receptor de TSLP/IL-50 es un heterodímero que consiste en la cadena alfa de IL-7R (SEQ ID NO: 2) y una cadena del receptor de tipo gamma (receptor de TSLP, TSLPR) (SEQ ID NO: 3) (véase, por ejemplo, Tonozyuka y col. (2001) *Cytogenet. Cell Genet.* 93:23-25; Pandey y col., (2000) *Nat. Immunol.* 1:59-64; L. S. Park y col., (2000) *J. Exp. Med.* 192:659-670; y Reche y col., anteriormente). La cadena del receptor de tipo común humano se identificó inicialmente debido a su homología con la cadena 8 del receptor de IL-2. Su función como la 2ª cadena del receptor de TSLP solo se reconoció más tarde (véase, por ejemplo, el documento WO 01/12672). Aunque TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) soporta los desarrollos de linfocitos B y T precoces murinos (véase, por ejemplo, Levin y col., (1999) *J. Immunol.* 162:677-683; Ray, y col., (1996) *Eur. J. Immunol.* 26:10-16), hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) activa las células dendríticas (CD) CD11c+, pero no tiene ningún efecto biológico directo sobre los linfocitos B, los linfocitos T, las células NK ni los mastocitos (véase, por ejemplo, Reche, y col., anteriormente). In vivo, se ha demostrado que las CD tratadas con TSLP estimulan la proliferación de linfocitos T no expuestos previamente (véase, por ejemplo, Reche, y col., anteriormente). Esto está de acuerdo con la coexpresión de ARNm para la subunidad delta 2 del receptor de hTSLP/IL-50 y la cadena alfa del IL-7R en CD CAD 11c+, pero no en otros tipos de células.

Los mecanismos y la patogenia de la inflamación, en concreto la inflamación alérgica, no se entienden del todo y, como tal, hasta ahora se desconocen las diversas terapias. La presente invención proporciona pruebas de que hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) puede participar en varios trastornos inflamatorios mediante su acción sobre determinadas subpoblaciones de células inmunitarias, en concreto las células dendríticas.

Sumario de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento del efecto de hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) sobre la actividad las células presentadoras de antígeno, por ejemplo las células dendríticas (CD), en concreto el cebado por

las CD de los linfocitos T que tiene como resultado inflamación, por ejemplo psoriasis o inflamación alérgica.

En el presente documento se describe un procedimiento de modulación del cebado por las células presentadoras de antígeno (CPA) de los linfocitos T, que comprende poner en contacto la CPA con un agonista de TSLP/IL-50 (SEC N° 1) o del receptor de TSLP/IL-50R (SEQ ID NO: 2, 3) o un antagonista de TSLP/IL-50 (SEC N° 1) o del receptor de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 2, 3). También se describe el procedimiento anterior, en el que el linfocito T es un linfocito T CD4+ no expuesto previamente, un linfocito T de memoria central o un linfocito T de memoria efector; en el que la CPA es una célula dendrítica (CD) CD11c+; en el que el cebado estimula la proliferación del linfocito T; en el que la proliferación es policlonal; o en el que la interacción entre la CPA y el linfocito T es autóloga o alogénica, o en el que la interacción es autóloga y produce un fenotipo de linfocitos T de memoria central.

También se describe el procedimiento anterior en el que el agonista o antagonista comprende un anticuerpo humanizado; un anticuerpo monoclonal; un anticuerpo policlonal; un fragmento Fab; un fragmento F(ab')₂; o un mimético peptídico de un anticuerpo; o en el que el agonista es TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) o un fragmento antigénico del mismo.

En otra realización, la invención abarca el uso del antagonista reivindicado que trata a un sujeto que sufre un trastorno inmunitario, que comprende tratar o administrar una cantidad eficaz de un antagonista de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) o TSLP/IL-50R (SEQ ID NO: 2, 3) como se especifica en la reivindicación. También se describe el procedimiento anterior, en el que el trastorno inmunitario es una afección inflamatoria y la administración comprende una cantidad eficaz de un antagonista de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) o TSLP/IL-50R (SEQ ID NO: 2, 3), en el que el trastorno inmunitario es psoriasis, artritis psoriásica. También se abarca el uso del antagonista reivindicado en el que el trastorno inmunitario es una respuesta inflamatoria pulmonar; o en el que la enfermedad inflamatoria pulmonar es asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) como se define en las reivindicaciones. También se describe el procedimiento anterior, en el que el trastorno inmunitario es inmunodeficiencia y la administración comprende una cantidad eficaz de un agonista de TSLP/IL50 (SEQ ID IL N° 1); en el que la inmunodeficiencia es un resultado de la citoablación de infección viral que produce inmunosupresión; en el que la administración comprende el tratamiento ex vivo de las células presentadoras de antígeno autólogas o alogénicas (CPA); o en el que la administración comprende el tratamiento ex vivo de las CPA con una cantidad eficaz de un agonista de TSLP/IL50 (SEQ ID NO: 1). La invención también contempla el procedimiento anterior en el que el antagonista comprende un anticuerpo humanizado; un anticuerpo monoclonal; un anticuerpo policlonal; un fragmento Fab; un fragmento F(ab')₂; o un mimético peptídico de un anticuerpo.

También se describe un procedimiento de inducción de la producción de IL-4, IL-5, and IL-13 por un linfocito T que comprende poner en contacto una CPA con un agonista de TSLP/IL-50 o del receptor de TSLP/IL-50 y cebar el linfocito T con CPA.

La invención abarca también el uso del antagonista reivindicado para modular la respuesta TH2 en un sujeto que comprende la administración de un antagonista de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) o de TSLP/IL-50R (SEQ ID NO: 2, 3).

La invención también se especifica en las reivindicaciones.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Como se usa en el presente documento, incluidas las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular tales como "uno", "una" y "el/la" incluyen las correspondientes referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

I. Definiciones.

"Activación", "estimulación" y "tratamiento", como se aplica a las células o a los receptores, puede tener el mismo significado, por ejemplo activación, estimulación o tratamiento de las células dendríticas (CD) con un ligando, a menos que el contexto indique lo contrario o lo contrario sea explícito.

"Administración" y "tratamiento", como se aplica al tratamiento de un sujeto humano o un animal, hace referencia al contacto de una composición o agente farmacéutico, terapéutico o diagnóstico con el sujeto o animal. "administración" y "tratamiento" también significa tratamiento ex vivo de, por ejemplo, una célula, tejido órgano, seguido del contacto de la célula, tejido u órgano con el sujeto o animal, incluso cuando el agente o la composición se ha metabolizado, alterado o degradado durante el tratamiento ex vivo.

"Alogénico", según se aplica a las células o a una reacción entre las células, hace referencia a, por ejemplo, una interacción en la que el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de una primera célula es reconocido como extraño por una segunda célula. "Autólogo", según se aplica a las células o a una reacción entre las células, hace referencia a, por ejemplo, una interacción en la que el MHC de una primera célula es reconocido como propio por una segunda célula (Abbas, y col., (2000) Cellular and Molecular Immunology. 4^a ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia).

“Cantidad eficaz” significa una cantidad suficiente para mejorar un síntoma o signo de la afección médica.

Expansión o proliferación “policlonal” significa que la proliferación de una célula implica el mantenimiento del fenotipo, mientras que expansión o proliferación “oligoclonal” significa que el fenotipo está alterado (Duarte, y col., (2002) *Gene Therapy* 9:1359-1368).

“Sensibilidad”, por ejemplo sensibilidad del receptor de los linfocitos T (TCR), significa que la unión de un ligando al TCR tiene como resultado un cambio detectable en el TCR o en acontecimientos o moléculas asociadas específicamente con el TCR, por ejemplo un cambio conformacional o fosforilación del TCR, un cambio en las proteínas asociadas con el TCR o un cambio en la expresión génica asociada con el TCR.

II. General.

La hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) (también conocida como linfopoyetina estromal tímica; TSLP) se descubrió originalmente en ratón y se encontró que desempeñaba un papel similar como su IL-7 homóloga como soporte del desarrollo precoz de linfocitos B y T (véase, por ejemplo, Sims, anteriormente; Levin y col., anteriormente; y Ray, y col., anteriormente). La TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) de ratón no activó las CD de ratón aisladas de bazo o generados por monocitos o la médula ósea. La presente invención demuestra que la TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) humana es un nuevo activador de CD. La TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) muestra varias características únicas cuando se compara con otros factores de activación de las CD, por ejemplo el ligando d Ecd40, LPS, o IL-7. Por ejemplo, induce los niveles más altos de CD40 y CD80 sobre las CD; activa las CD para inducir la proliferación y expansión de linfocitos T CD4 no expuestos previamente más potentes; no parece inducir la producción por las CD de varias de las citocinas proinflamatorias conocidas, sino que induce la producción quimiocinas atrayentes TH2 TARC y MDC, y hace que las CD ceben los linfocitos T CD4+ no expuestos previamente para que produzcan niveles altos de las citocinas TH2 IL-4, IL-5, IL-13 y TNF-alfa. Es interesante el hecho de que la producción de la citocina proinflamatorias IL-10 y la citocina de TH1 IFN-gamma está inhibida. Estas características sugieren enérgicamente que la hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) representa un mediador crucial en la inflamación no controlada, en concreto la inflamación alérgica.

La activación de las CD parece ser una etapa crucial en la patogenia de las inflamaciones alérgicas mediadas por TH2, por ejemplo el asma. Las células dendríticas que presentan el alérgeno a las células Th2 activan la liberación por las células Th2 de citocinas, por ejemplo IL-4, IL-5 y IL-13, de modo que estas citocinas contribuyen de modos diferentes a la patología del asma. La IL-4 estimula incrementos en las moléculas de adhesión de las células endoteliales de las vías respiratorias y la producción de quimiocinas, la IL-5 provoca producción de eosinófilos, mientras que la IL-13 estimula la hiperreactividad del músculo liso (Lewis (2002) *Curr. Opinion Immunol.* 14:644-651). Las moléculas de la adhesión celular estimuladas por la IL-4 sirven como receptores de las células inflamatorias (Striz, y col., (1999) *Am J. Physiol.* 277:L58-L64). La IL-4 y la IL-13 activan los linfocitos B, lo que tiene como resultado proliferación de linfocitos B y síntesis de IgE (Busse y Lemanske (2001 *New Engl. J. Med.* 344:350-362). La IL-4 se sobreexpresa en las vías respiratorias de los asmáticos alérgicos, mientras que la IL-13 se sobreexpresa en las vías respiratorias en el asma alérgico y el asma no alérgico (Wills-Karp, y col., (1998) *Science* 282:2258 -2260). La IL-4 parece más importante en la sensibilización primaria a alérgenos, mientras que la IL-13 parece más importante durante la exposición secundaria a los alérgenos Kips (2001) *Eur. Resp. J. Suppl.* 34:24s-33s).

Aunque las CD de individuos alérgicos inducen, preferentemente, una respuesta de tipo TH2 con (véase, por ejemplo, Hammad y col., (2001) *Blood* 98, 1135-41) o son (véase, por ejemplo, P. A. Srumbles, anteriormente; McWilliam y col., (1996) *J. Exp. Med.* 184:2429-32; N. Novak y col., (1999) *Allergy* 54:792-803; Tunon-De-Lara y col., (1996) *Clin. Exp. Allergy* 26:648-655; y Holt (1997) *Adv. Exp. Med. Biol.* 417:301-306) sensibilización con un alérgeno, el mecanismo molecular subyacente a la señalización de las CD para inducir enfermedades alérgicas de TH2 no se entiende claramente. Los presentes hallazgos de que hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) se expresa considerablemente en los queratinocitos de dermatitis atópica y que las CD activadas por la hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) sensibilizan considerablemente los linfocitos T CD4+ no expuestos previamente para que produzcan IL-4, IL-5, IL-13 y TNF-alfa sugieren que la hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) representa el factor crítico que faltaba para comprender la patogenia de las enfermedades alérgicas.

La hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) producida por las células epiteliales, u otras células estromales en el lugar de entrada del antígeno, activarán las CD y estimularán las CD para que produzcan las quimiocinas atrayentes de TH2 tales como TARC y MDC. Las CD activadas por la hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) migran hacia los ganglios linfáticos drenantes para que induzcan la proliferación de linfocitos T específicos del alérgeno y la diferenciación en células TH2. Estas células TH2 F específicas de alérgeno pueden migrar de nuevo hacia TARC y MDC en el lugar original de la inflamación para que desencadenen la inflamación alérgica, de modo que se establece una relación funcional directa entre las células epiteliales, las CD y las respuestas inmunitarias mediadas por los linfocitos T.

Al contrario que las células TH2 clásicas, que producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, los linfocitos T CD4+ humanos activados por CD estimuladas con hTSLP/IL-50 producen IL-4, IL-5 e IL-13, pero no IL-10. Aunque la IL-10 se ha

incluido históricamente como una citocina TH2 (véase, por ejemplo, Abbas y col., (1996) *Nature* 383:787-793), su contribución a la inflamación alérgica mediada por TH2 ha sido controvertida. Mientras que algunos estudios mostraron que los niveles de ARNm de IL-10 en pulmones, intestino y piel aumentaban en pacientes con asma alérgico o dermatitis atópica (véase, por ejemplo, Robinson y col., (1996) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 14:113-117), la medición directa de la proteína IL-10 mediante ELISA (Ensayo de Inmunosorción Ligado a Enzimas) mostró niveles marcadamente menores de IL-10 en el lavado broncoalveolar o en los sobrenadantes de los cultivos de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes atópicos, en comparación con sujetos control normales (véase, por ejemplo, Borish y col., (1996) *J. Allergy Clin. Immunol.* 97:1288-96). Los estudios realizados en modelos de ratón confirman un papel de la IL-10 en la supresión de la inflamación de las vías respiratorias y la producción de citocinas (véase, por ejemplo, Akbari, y col., (2001) *Nat. Immunol.* 2:725-731; y Zuany-Amorim y col., (1995) *J. Clin. Invest.* 95:2644-2651). Por tanto, niveles elevados de IL-4, IL-5, IL-13 y TNF-alfa y niveles disminuidos de IL-10 e IFN-gamma producidos por linfocitos T activados por CD estimuladas por hTSLP/IL-50 pueden representar las citocinas inflamatorias alérgicas reales subyacentes en la fisiopatología de la dermatitis atópica o el asma. La IL-10 es una citocina proinflamatoria, pero no una citocina TH2 proalérgica.

También se describe la primera evidencia de que las células epiteliales de la piel y la mucosa interactúan directamente con las CD durante la inflamación alérgica produciendo TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1). La TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) no solo activa potentemente las CD sino que también proporcionan a las CD la capacidad de polarizar los linfocitos T no expuestos previamente para producir citocinas TH2 proalérgicas. La TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) representa una nueva diana para bloquear las enfermedades inflamatorias y alérgicas.

La presente especificación describe procedimientos y reactivos para potenciar la respuesta mediada por TH2 mediante agonismo de las actividades de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1). La potenciación de esta respuesta es útil en el tratamiento de trastornos producidos por supresión del sistema inmunitario, por ejemplo VIH. El aumento de la actividad de las células dendríticas será útil en el tratamiento de infecciones víricas, bacterianas o fúngicas. La TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) y/o los agonistas de la misma será también útil como adyuvantes de vacuna.

La supresión de la respuesta de las CD es útil para el tratamiento de varios trastornos y afecciones inmunitarias, por ejemplo inflamación alérgica, hiperreactividad bronquial, asma, rinitis, alimentos: alergia, rechazo de trasplantes, enfermedad del injerto contra el huésped, enfermedades autoinmunitarias, infecciones víricas que producen inmunosupresión, psoriasis y dermatitis atópica.

III. Antagonistas y agonistas.

El bloqueo de las actividades de hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) se puede conseguir mediante antagonistas de la citocina, por ejemplo anticuerpos frente al ligando, anticuerpos frente al receptor etc. Se ha demostrado que la interferencia con la interacción ligando-receptor es una estrategia eficaz para el desarrollo de antagonistas.

Existen varios medios para antagonizar la actividad mediada por ligandos. Dos medios evidentes son para bloquear el ligando con anticuerpos; un segundo es bloquear el receptor con anticuerpos. En cada uno existen varios epítomos sobre los cuales bloquean su interacción produciendo hidrancia estérica que bloquea la interacción. La correlación de la capacidad para bloquear la señalización no necesariamente se correlacionaría con la afinidad de unión al ligando o a los receptores. Otro medio es usar un ligando luteína que conserva la actividad de unión al receptor, pero no induce la señalización del receptor. La luteína puede ser un inhibidor competitivo de la señalización del ligando.

Como alternativa se puede buscar en pequeñas bibliotecas de moléculas compuestas que pueden bloquear la interacción o señalización mediada por un apareamiento ligando-receptor identificado.

La presente invención proporciona el uso de un anticuerpo o composición de unión que se une específicamente a un ligando de citocina especificado, preferentemente de mamífero, por ejemplo de primate, ser humano, gato, perro, rata o ratón. Se pueden producir anticuerpos frente a varias proteínas citocinas, incluidas variantes individuales, polimórficas, alélicas, de cepas o de especies, y fragmentos de las mismas, tanto en sus formas naturales (de longitud completa) como en sus formas recombinantes. Adicionalmente, se pueden producir anticuerpos frente a las proteínas receptoras tanto en sus formas nativas (o activas) como en sus formas inactivas, por ejemplo desnaturalizadas. También se pueden usar anticuerpos antiidiotípicos.

Se puede seleccionar una serie de inmunógenos para producir anticuerpos específicamente reactivos con proteínas de ligando o receptor. La proteína recombinante es un inmunógeno preferido: para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales. La proteína natural, de fuentes adecuadas, por ejemplo de primates, roedores etc., también se puede usar en forma pura o impura. Los péptidos sintéticos, fabricados usando las secuencias proteicas adecuadas, también se pueden usar como inmunógeno para la producción de anticuerpos. La proteína recombinante se puede expresar y purificar en células eucariotas o procariotas como se describe en, por ejemplo, Coligan y col., (eds. 1995 y suplementos periódicos) *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley and Sons, New York, NY; y Ausubel, y col., (eds. 1987 y suplementos periódicos) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene/Wiley, New York, NY. Se puede usar material plegado de forma natural o desnaturalizado, según sea adecuado, para producir anticuerpos. Se pueden generar anticuerpos monoclonales o policlonales, por ejemplo para su uso posterior en

inmunoensayos para medir la proteína o para procedimientos de inmunopurificación.

Los procedimientos de producción de anticuerpos policlonales son bien conocidos para los expertos en la técnica. Normalmente un inmunógeno, preferentemente una proteína purificada, se mezcla con un adyuvante y se inmuniza a los animales con la mezcla. La respuesta inmunitaria del animal a la preparación inmunogénica se monitoriza realizando análisis de sangre y determinando el título de reactividad a la proteína de interés. Por ejemplo, cuando se obtienen títulos adecuadamente altos de anticuerpos frente al inmunógeno, normalmente tras varias inmunizaciones, se extrae sangre del animal y se prepara el antisuero. Si se desea se puede realizar el posterior fraccionamiento del antisuero para enriquecer los anticuerpos reactivos frente a la proteína. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane; o Coligan. La inmunización se puede realizar también mediante otros procedimientos, por ejemplo inmunización con vector de ADN. Véase, por ejemplo, Wang y col. (1997) *Virology* 228:278-284.

Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante diversas técnicas conocidas por los investigadores expertos en la técnica. Normalmente, se inmortalizan los esplénocitos procedentes de un animal inmunizado con un antígeno deseado, normalmente mediante fusión con una célula de mieloma. Véase Kohler y Milstein (1976) *Eur. J. Immunol.* 6:511-519. Procedimientos alternativos de immortalización incluyen transformación con el virus de Epstein Barr Virus, oncogenes, o retrovirus, u otros procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Doyle y col., (eds. 1994 y suplementos periódicos) *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*, John Wiley and Sons, New York, NY. Las colonias que se producen de células únicas immortalizadas se someten a detección selectiva de la producción de anticuerpos de la especificidad y afinidad deseadas por el antígeno, y el rendimiento de los anticuerpos monoclonales producidos por dichas células se puede potenciar mediante varias técnicas, incluyendo la inyección en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado. Como alternativa se pueden aislar secuencias de ADN que codifican un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del mismo mediante detección selectiva de una biblioteca de ADN de linfocitos B humanos de acuerdo con, por ejemplo, el protocolo general indicado por Huse y col., (1989) *Science* 246:1275-1281.

Los anticuerpos o composiciones de unión, incluidos los fragmentos de unión, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fv, Fab, o F(ab')₂ de anticuerpos, contra fragmentos predeterminados de proteínas ligando o receptor se pueden producir mediante inmunización de los animales con conjugados de los fragmentos de las proteínas ligando o receptor con proteínas transportadoras. Los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de células que secretan el anticuerpo deseado. Estos anticuerpos se pueden someter a detección selectiva de la unión a la proteína normal o defectuosa. Normalmente, estos anticuerpos monoclonales se unirán con al menos una Kd de aproximadamente 1 μ M, más normalmente de al menos aproximadamente 300 μ M, habitualmente de al menos aproximadamente 10 μ M, más habitualmente de al menos aproximadamente 30 μ M, preferentemente de al menos aproximadamente 10 μ M, y más preferentemente de al menos aproximadamente 3 μ M, o mejor.

En algunos casos, es deseable preparar anticuerpos monoclonales (mAb) de varios huéspedes de mamífero, tales como ratones, roedores, primates, seres humanos etc. La descripción de técnicas para preparar dichos anticuerpos monoclonales se puede encontrar en, por ejemplo, Stites, y col. (eds.) *Basic and Clinical Immunology*. 4ª ed., Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y las referencias citadas en el mismo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. 2nd ed., Academic Press, New York, NY; y, en particular, en Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497, que tratan un procedimiento de generar anticuerpos monoclonales. En resumen, este procedimiento implica inyectar un animal con un inmunógeno. Después, se sacrifica al animal y se extraen células del bazo, que después se fusionan con células de mieloma. El resultado es una célula híbrida o "hibridoma" que es capaz de reproducirse in vitro. La población de hibridomas se selecciona después para aislar clones individuales, cada uno de los cuales secreta una única especie de anticuerpo frente al inmunógeno. De este modo, la especie de anticuerpo individual obtenida son los productos de células B únicas immortalizadas y clonadas del animal inmune generado en respuesta a un sitio específico reconocido sobre la sustancia inmunogénica.

Otras técnicas adecuadas implican la selección de bibliotecas de anticuerpos en fagos o vectores similares. Véase, por ejemplo, Huse y col. (1989) *Science* 246:1275-1281; y Ward, y col., (1989) *Nature* 341:544-546. Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención se pueden usar con o sin modificación, incluidos los anticuerpos quiméricos o humanizados. Con frecuencia, los polipéptidos y anticuerpos se marcan uniéndolos, bien covalente o no covalentemente, una sustancia que proporciona una señal detectable. Se conocen una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación y se han publicado extensamente en la literatura científica y de patentes. Marcadores adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de dichos marcadores incluyen las patentes de EE.UU. n.º 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241. Asimismo, se pueden producir inmunoglobulinas recombinantes, véase Cabilly, patente de EE.UU. n.º 4.816.567; y Queen y col., (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:10029-10033; o se fabrican en ratones transgénicos, véase Mendez, y col., (1997) *Nature Genetics* 15:146-156; véase también Abgenix and Medarex technologies.

Los anticuerpos son simplemente una forma de composiciones de unión específica. Otras composiciones de unión que a menudo tendrán usos similares incluyen moléculas que se unen con especificidad a un ligando o receptor, por ejemplo de un modo pareja de unión-pareja de unión, una interacción anticuerpo-antígeno o en una interacción

proteína-proteína natural fisiológicamente relevante, bien covalente o no covalente, por ejemplo proteínas que se asocian específicamente con la proteína deseada. La molécula puede ser un polímero o un reactivo químico. Un análogo funcional puede ser una proteína con modificaciones estructurales o puede ser una molécula estructuralmente no relacionada, por ejemplo que tiene una forma molecular que interacciona con los determinantes de unión adecuados. Los compuestos de unión a anticuerpo, incluidos los fragmentos de unión, como se describe en el presente documento, pueden tener valor diagnóstico o terapéutico significativo. También pueden ser útiles como compuestos de unión no neutralizantes y se pueden acoplar a toxinas o radionúclidos, de modo que cuando el compuesto de unión se une al antígeno una célula que lo expresa, por ejemplo sobre su superficie, muere. Además, estos compuestos de unión se pueden conjugar con fármacos u otros agentes terapéuticos, bien directa o indirectamente, por medio de un ligador, y pueden dirigir los fármacos.

Se dispone de anticuerpos frente a TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) (Soumelis, y col., anteriormente). Las regiones de mayor antigenicidad en TSLP/IL-B50 humana (SEQ ID NO: 1) incluyen KAAYL (aminoácidos 40-44); KD (49-50); KS (59-60); PHC (73-75); ASLAK (91-95); TKAAL (102-106); KKRRKRKV (125-132); y PLLKQ (154-158). Se dispone de anticuerpos frente a IL-7R α (SEQ ID NO: 2) (Pandey col., anteriormente). Se dispone de anticuerpos anti-TSLPR (R & D Systems, Minneapolis, MN, n° cat. MAB981; DnAX Research, Inc., Palo Alto, CA). También se preparan anticuerpos contra TSLPR (SEQ ID NO: 3) mediante inmunización con, por ejemplo, regiones de mayor antigenicidad determinado mediante el gráfico de Welling de Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD). Las regiones de mayor antigenicidad en el TSLPR incluyen HYR (residuos aminoácidos 59-61); YYLKP (115-119); KHV (123-125); WHQDAV (129-134); KPKLSK (226-231); y AHLHKM (294-299) de la SEQ ID NO: 3, en la que la región N-terminal es citosólica y se ha predicho que la región transmembrana del TSLPR humano está en aproximadamente los residuos 203-207 (Blagoev, y col., (2002) Gene 284:161-168; Park, y col., anteriormente).

Los agonistas incluyen la propia proteína citocina TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1), que se puede usar para inducir la señalización del receptor.

IV. Usos diagnósticos; composiciones terapéuticas, procedimientos

La invención proporciona el uso de los antagonistas reivindicados para el tratamiento de arios trastornos relacionados con la inflamación (según lo reivindicado), por ejemplo inflamación alérgica. La etiología y la patogenia a menudo no se conocen bien, pero producen significativas molestias o morbilidad en pacientes. Como se indica más adelante, la administración de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) a las CD CD11 c+ en la sensibilización de los linfocitos T CD4+ para producir IL-4, IL-5, IL-13 y TNF-alfa y, por tanto, los agonistas o antagonistas pueden ofrecer una modalidad terapéutica para potenciar o suprimir el sistema inmunitario.

Los procedimientos diagnósticos incluyen aspectos tales como la predicción del pronóstico; la definición de subpoblaciones que responderán o no responderán a una evolución terapéutica concreta; el diagnóstico de trastornos relacionados con huesos o el sistema inmunitario o subtipos de estos trastornos; o evaluar la respuesta a la terapia. La especificación también contempla un anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, que comprende un marcador detectable, por ejemplo un marcador fluorescente, epitópico, enzimáticamente activo o radiactivo.

Los antagonistas o agonistas de la actividad de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) pueden estar implicados de un modo que sugieran efectos terapéuticos significativos, por ejemplo para disminuir o prevenir la aparición de síntomas. Los antagonistas de la presente invención se pueden administrar solos o en combinación con otro inhibidor o agonista del mismo o vía acompañante; u otros compuestos usados para el tratamiento de los síntomas, por ejemplo antagonistas o esteroides tales como glucocorticoides.

Esto se puede efectuar mediante administración directa del agonista o antagonista o quizá usando una estrategia de terapia génica. El antagonismo se puede efectuar mediante, por ejemplo, tratamiento antisentido, anticuerpos u otra supresión de los efectos de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1).

Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles que incluyan el anticuerpo, la composición de unión del mismo, el agonista de la citocinas o el antagonista de moléculas pequeñas, La entidad se mezcla con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable que es, preferentemente, inerte. La preparación de dichas composiciones farmacéuticas se conoce en la técnica, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences y U.S. Pharmacopeia National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984).

Normalmente, los anticuerpos, composiciones de unión o citocinas se administran por vía parenteral, preferentemente intravenosa. Dado que estas proteínas o péptidos pueden ser inmunogénicas, se administran preferentemente despacio, bien mediante un conjunto de administración i.v. convencional o a partir de un depósito subcutáneo, por ejemplo como enseñan Tomasi, y col., patente de EE.UU. n° 4,732,863. Se pueden aplicar medios para minimizar las reacciones inmunológicas. Las entidades moleculares pequeñas pueden ser oralmente activas.

Cuando se administran por vía parenteral, los productos biológicos se formularán en forma inyectable monodosis (solución, suspensión, emulsión) en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Normalmente, dichos vehículos son de forma inherente no tóxicos y no terapéuticos. Los terapéuticos se pueden

administrar en vehículos acuosos tales como agua, solución salina o vehículos tamponados con o son varios aditivos y/o agentes diluyentes. Como alternativa se puede preparar una suspensión, tal como una suspensión de cinc, para incluir el péptido. Dicha suspensión puede ser útil para inyección subcutánea (SC) o intramuscular (IM). La proporción de sustancia biológica y aditivo puede variar en un amplio intervalo siempre que ambos estén presentes en cantidades eficaces. Preferentemente, el anticuerpo se formula en forma purificada sustancialmente libre de agregados, otras proteínas, endotoxinas y similares, a concentraciones de aproximadamente 5 a 30 mg/ml, preferentemente de 10 a 20 mg/ml. Preferentemente, los niveles de endotoxina son inferiores a 2,5 UE/ml Véase, por ejemplo, Avis y col., (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications* 2ª ed., Dekker, NY; Lieberman, y col., (eds. 1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* 2a ed., Dekker, NY; y Lieberman, y col. (eds. 1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Dekker, NY).

La selección de un régimen de administración para una sustancia terapéutica depende de varios factores, incluidos la tasa de recambio sérico o tisular de la entidad, el nivel de síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células diana, el momento de la administración etc. Preferentemente, un régimen de administración maximiza la cantidad de sustancia terapéutica liberada en el paciente consistente con un nivel aceptable de efectos secundarios. De acuerdo con esto, la cantidad de sustancia biológica liberada depende, en parte, de la entidad concreta y de la gravedad de la afección que se esté tratando. La guía en la selección de las dosis de anticuerpo adecuadas se encuentra en, por ejemplo, Bach y col., capítulo 22, en Ferrone, y col., (eds.) (1985) *Handbook of Monoclonal Antibodies*, Noyes Publications, Park Ridge, NJ; y Haber, y col., (eds.) (1977) *Antibodies in Human Diagnosis and Therapy*, Raven Press, New York, NY (Russell, pgs. 303-357, y Smith, y col., pgs. 365-389). Como alternativa, las dosis de citocinas o de moléculas pequeñas se determinan usando metodologías estándar.

La determinación de la dosis adecuada la realiza el clínico usando, por ejemplo, parámetros o factores conocidos o que se sospecha en la técnica que afectan al tratamiento o que se ha predicho que afectan al tratamiento. EN general, la dosis comienza con una cantidad algo inferior a la dosis óptima y después se aumenta en pequeños incrementos hasta conseguir el efecto óptimo o deseado respecto a cualquier efecto secundario negativo. Medidas diagnósticas importantes incluyen las de los síntomas de, por ejemplo, la inflamación o el nivel de citocinas inflamatorias producidas. Preferentemente se usará una sustancia biológica derivada de la misma especie que el animal al que está dirigido el tratamiento, de modo que se minimiza una respuesta humoral al reactivo.

Los intervalos de dosis semanales totales para los anticuerpos o fragmentos de los mismos, que se unen específicamente al ligando o al receptor varían generalmente de aproximadamente 10 µg, más generalmente de aproximadamente 100 µg, normalmente de aproximadamente 500 µg, más normalmente de aproximadamente 1.000 µg, preferentemente de aproximadamente 5 mg y más preferentemente de aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal. EN general, el intervalo será inferior a 100 mg, preferentemente inferior a aproximadamente 50 mg y, más preferentemente, inferior a aproximadamente 25 mg por kilogramo de peso corporal. Los agonistas o terapéuticos de moléculas pequeñas se pueden usar a molaridades similares.

Los intervalos de dosis semanales de los antagonistas de la señalización mediada por los receptores de citocinas, por ejemplo anticuerpos o fragmentos de unión, varían de aproximadamente 1 µg, preferentemente de al menos aproximadamente 5 µg, y más preferentemente de al menos aproximadamente 10 µg por kilogramo de peso corporal. En general, el intervalo será inferior a 1.000 µg, preferentemente inferior a aproximadamente 500 µg y, más preferentemente, inferior a aproximadamente 100 µg por kilogramo de peso corporal. Las dosis se administran según un programa que efectúa el tratamiento deseado y puede ser periódico durante un periodo más corto o más largo. En general, los intervalos serán de al menos aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mg, preferentemente de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal. Los agonistas de citocinas o sustancias terapéuticas de molécula pequeña normalmente se usarán en cantidades molares similares, pero dado que probablemente tengan pesos moleculares más pequeños, tendrán dosis en peso menores.

La presente invención también proporciona la administración de sustancias biológicas en combinación con terapias conocidas, por ejemplo esteroides, en particular glucocorticoides, que alivian los síntomas, por ejemplo asociados con la inflamación, o antibióticos o antiinfecciosos. Las dosis diarias para los glucocorticoides variarán de al menos aproximadamente 1 mg, generalmente de al menos aproximadamente 2 mg y, preferentemente, de al menos aproximadamente 5 mg al día. En general, la dosis será inferior a aproximadamente 100 mg, normalmente inferior a aproximadamente 50 mg, preferentemente inferior a aproximadamente 20 mg y, más preferentemente, de al menos aproximadamente 10 mg al día. En general, los intervalos serán de al menos aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg, preferentemente de aproximadamente 2 mg a 50 mg al día. También se conocen combinaciones de dosis adecuadas con antibióticos, antiinfecciosos o antiinflamatorios.

Huéspedes mamíferos típicos incluirán ratones, ratas, gatos, perros y primates, incluidos seres humanos. Una cantidad eficaz para un paciente concreto puede variar en función de factores tales como la afección que se esté tratando, la salud general del paciente, el procedimiento, la vía y la dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios. Cuando se combinan, una cantidad eficaz está en proporción con una combinación de componentes y el efecto no está limitado a los componentes individuales por separado.

Una cantidad eficaz de la sustancia terapéutica disminuirá los síntomas normalmente en al menos aproximadamente un 10 %, normalmente en al menos aproximadamente un 20 %, preferentemente en al menos aproximadamente un 30 % o, más preferentemente, en al menos aproximadamente un 50 %. La presente invención proporciona reactivos que encontrarán uso en aplicaciones terapéuticas como se describe en otro lugar del presente documento, por ejemplo en la descripción general para tratar trastornos asociados con las indicaciones descritas anteriormente. Berkow (ed.) The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Merck & Co., Rahway, N.J.; Braunwald, y col., (eds.) (2001) Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, NY; Gilman, y col., (eds.) (1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8ª Ed., Pergamon Press; y Remington's Pharmaceutical Sciences, 17a ed. (1990), Mack Publishing Co., Easton, Penn. Langer (1990) Science 249:1527-1533; Merck Index, Merck & Co., Rahway, New Jersey; y Physician's Desk Reference (PDR); Cotran, y col., (eds), anteriormente; y Dale y Federman (eds.) (2000) Scientific American Medicine, Healtheon/WebMD, New York, NY.

Ejemplos

I. Procedimientos generales.

Algunos de los procedimientos convencionales se describen o se hace referencia a ellos en, por ejemplo, Maniatis y col. (1982) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press; NY; Sambrook, y col., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2ª ed.), vols. 1-3, CSH Press, NY; Ausubel, y col., Biology, Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; o Ausubel, y col., (1987 y suplementos periódicos) Current Protocols in Molecular Biology, Greene/Wiley, New York. Los procedimientos para purificación de proteínas incluyen procedimientos tales como precipitación con sulfato amónico, cromatografía de columna, electroforesis, centrifugación, cristalización y otros Véase, por ejemplo, Ausubel, y col. (1987 y suplementos periódicos); Deutscher (1990) "Guide to Protein Purification" en Meth. (Enzymology, vol. 182, y otros volúmenes en esta serie; y bibliografía del fabricante sobre el uso de productos de purificación de proteínas, por ejemplo Pharmacia, Piscataway, N.J., or Bio-Rad, Richmond, CA. La combinación con técnicas recombinantes permite la fusión a segmentos adecuados, por ejemplo, a una secuencia FLAG o una equivalente que puede fusionarse mediante una secuencia escindible con proteasa. Véase, por ejemplo, Hochuli (1990) "Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent" en Setlow (ed.) Genetic Engineering, Principle and Methods 12:87-98, Plenum Press, N.Y.; y Crowe, y col. (1992) QTAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA.

Se dispone de paquetes de software para determinar, por ejemplo los fragmentos antigénicos, la señal y las secuencias líder, el plegamiento proteico y los dominios funcionales. Véase, por ejemplo, Vector NTI® Suite (Informax, Inc., Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA), y DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne, 2000) Bioinformatics 16:741-742. Se usaron también bases de datos de secuencias públicas, de, por ejemplo, GenBank y otros.

II. TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) Activación de CD CD11c+.

Las CD CD11c+ se purificaron de capas leucocíticas de sangre de adultos de donantes de sangre de voluntarios sanos (Stanford Medical School Blood Center, Stanford, CA) tras la separación de PBMC mediante centrifugación e Ficoll y depleción negativa de células que expresan CD3, CD14, CD19, CD56 y glicoforina A usando perlas magnéticas (Dynal, Oslo, Noruega). Las células deplecionadas se tiñeron además con anti-CD4-TC (Caltag, Burlingame, CA), anti-CD11c-PE y anti-CD3, CD14, CD16-FITC (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Los linfocitos T CD11c+ CD4+ se aislaron usando un Vantage FACSsorter® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) para alcanzar una pureza >99 %.

Las CD CD11c+ se cultivaron inmediatamente después de clasificar en RPMI que contiene 10 % de FCS, 1 % de piruvato, 1 % de HEPES y penicilina/estreptomicina. Las células se sembraron a 0,5 x 10⁶/ml en placas de 96 pocillos de fondo plano en presencia de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) (15 ng/ml), IL-7 (50 ng/ml), LPS (1 mg/ml.), fibroblastos L transfectados con CD40-ligando (2,5 x 10⁴/pocillo) o medio de cultivo solo. Tras 24 horas de cultivo, se recolectaron las CD y se resuspendieron en un medio que contiene EDTA para disociar los grupos. Las CD viables se contaron primero usando exclusión con azul tripan de células muertas.

Las células restantes se tiñeron con diversos anticuerpos monoclonales (mAb) conjugados con FITC anti-humanos de ratón incluidos anti-HLA-DR (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), anti-CD40, CD80 y CD86 (todos de Pharmingen, San Diego, CA) o un control isótopo de IgG1 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), y se analizaron con un citómetro de flujo FACScan® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Las células muertas se excluyeron basándose en las características de dispersión lateral y hacia delante. Para la detección de apoptosis, las células se tiñeron durante 5-10 minutos con anexina V-FITC (Promega, Madison, WI) y se analizaron en un citómetro de flujo FACScan® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) sin exclusión de células muertas. TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1), IL-7, CD40-ligando y LPS todos regularon por aumento los HLA-DR, CD40, CD80, CD86 y CD83 de superficie sobre las CD cuando se compararon con medio solo. La hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) fue al menos dos veces tan potente como la IL-7 en la regulación por aumento de estos marcadores. Es interesante el hecho de que mientras que la TSLP/IL- 50 (SEQ ID NO: 1) inducía los niveles más altos de expresión de CD40 y CD80 en las CD, el CD40-ligando

indujo mayores niveles de HLA-DR y CD83. La capacidad de la TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) para regular por aumento el HLA-DR y las moléculas coestimuladoras se bloqueó neutralizando los anticuerpos monoclonales específicos de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1), lo que indica que los efectos observados de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) en las CD CD11c⁺ eran específicos. Como CD40L, TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) no solo activó las CD sino que también mantuvieron la supervivencia de las CD en cultivos de 24 horas, como se muestra mediante tinción con anexina V y recuentos celulares. Morfológicamente, tanto las CD estimuladas con TSLP/IL-50 como las CD-CD40L muestran largas dendritas y expresan HLA-DR y la glicoproteína de membrana asociada con lisosoma de las células dendríticas (CD- LAMP) cuando se compara con las CD en medio o las CD-IL-7.

- 10 CD-LAMP es un marcador de activación de las CD. CD-LAMP se induce rápidamente mediante TNF-alfa, LPS o CD40L y se puede usar para la presentación antigénica (Saint-Vis, y col., (1998) *Immunity* 9:325-336).

III. Sensibilización de linfocitos naive T CD4 no expuestas anteriormente.

- 15 Las CD CD11c⁺ se recogieron tras 24 horas de cultivo en diferentes condiciones, se lavaron dos veces para eliminar cualquier citocina y se co-cultivaron con 5×10^4 linfocitos naive T CD4⁺ no expuestas previamente alogénicas recién purificadas en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo redondo. Los co-cultivos se llevaron a cabo por triplicado a proporciones CD/T crecientes. Las CD y los linfocitos T solos se usaron como controles. Tras 5 días, se dieron pulsos a las células con ³H-timidina 1mCi (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) durante 16 horas antes de
20 recoger y contar la radiactividad.

- Más sorprendentemente, las CD estimuladas con TSLP/IL-50 indujeron la proliferación más fuerte de linfocitos T CD4 no expuestos previamente en una reacción linfocitaria mixta alogénica en comparación con CD-CD40L, CD-LPS o CD-IL-7. A una proporción de 1 CD por 150 linfocitos T, las CD activadas por TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) todavía indujeron una muy fuerte proliferación de linfocitos T CD4 no expuestos previamente alogénicos, que fue aproximadamente 10 veces más fuerte que la inducida por las CD-CD40L. Tras 6 días de cultivo, las CD estimuladas con TSLP/IL-50 indujeron un incremento de 2,5 a 10 veces el número total de linfocitos T, más que el inducido por las CD-CD40L, CD-LPS o CD-IL-7. Por tanto, la TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) representa uno de los factores de activación de CD más potentes y las CD estimuladas mediante TSLP/IL-50 inducen la proliferación y expansión más
25 impresionantes de linfocitos T CD4 no expuestos previamente alogénicos.
30

IV. La expresión de citocinas y quimiocinas en CD sensibilizó linfocitos T no expuestos previamente

- Los linfocitos T se recogieron al 6° día del co-cultivo, se lavaron dos veces y se volvieron a estimular con PMA e ionomicina en placas de 48 o de 96 pocillos de fondo plano a una concentración de 1×10^6 /ml. Tras 2,5 horas se añadió Brefeldin A a 10 mg/ml. Tras 5 horas se recogieron las células, se fijaron con 2 % de formaldehído, se permeabilizaron con 10 % de saponina y se tiñeron con mAb conjugados con PE frente a IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 y TNF-alfa y mAb conjugados con FITC frente a IFN-gamma (todos de Pharmingen, San Diego, CA). Las células teñidas se analizaron en un citómetro de flujo FACScan® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

- En estudios previos se ha demostrado que la mayoría de las señales de activación de CD, tales como CD40L y LPS, induce la producción por las CD de citocinas proinflamatorias (IL-1 alfa/beta, IL-6 y IL-12) y la sensibilización de la diferenciación de linfocitos T CD4 no expuestos previamente hacia TH1 (Guermonprez, y col., (2002) *Annu. Rev. Immunol.* 20:621-667; Banchereau, y col., (2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18:767-811). Para investigar los efectos de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) sobre la expresión de citocinas en las CD, los inventores realizaron primero una detección selectiva de ARNm cuantitativa global de 11 citocinas diferentes (IL-1-alfa, IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p35, IL- 12p40, IL-13, IL-18, IL-23p19 y TNF-alfa) y 12 quimiocinas diferentes (TARC, DCCK1, MDC, MCP1, MCP2, MCP3alfa, MCP4, eotaxina, MIP3, MIG, Rantes e IL-8). Sorprendentemente, al contrario que las CD-CD40L, las CD tratadas con TSLP/IL-50 no produjeron ARNm para todas las citocinas proinflamatorias analizadas pero produjeron niveles altos de ARNm para las quimiocinas TARC y MDC. Los análisis ELISA confirmaron a nivel proteico que las CD activadas por TLSP no producían cantidades detectables de las citocinas proinflamatorias IL-1beta, IL-6, IL- 12p70 and TNF-alfa, sino niveles elevados de las quimiocinas TARC y MDC (2001) *J. Immunol.* 167:336-343). TARC y MDC atraen preferentemente las células TH2 que expresan CCR4.

- A continuación se comparó la capacidad de las CD estimuladas con hTSLP/IL-50 para polarizar los linfocitos T CD4 no expuestos anteriormente con las CD cultivadas respectivamente con medio, IL-7, CD40L o LPS. Los linfocitos T CD4⁺CD45RA⁺ humanos no expuestos previamente purificados de sangre periférica de adulto se co-cultivaron con las CD a una proporción de 1/5 durante 6 días, se lavaron para eliminar todas las citocinas, se volvieron a estimular 24 horas con anti-CD3 y anti-CD28 y se midió la producción de citocinas en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA. Sorprendentemente, las CD estimuladas con TSLP/IL-50 inducían la producción por los linfocitos T CD4 no expuestos previamente los niveles más altos de citocinas TH2 IL-4, IL-5 e IL-13, junto con la citocina proinflamatoria TNF-alfa. Las CD estimuladas con TSLP/IL-50 inducen la producción por los linfocitos T CD4⁺ no expuestos previamente los niveles más bajos de la citocina antiinflamatoria IL-10 y la citocina TH1 IFN-gamma cuando se comparó con las CD cultivadas con medios solo u otros activadores. La capacidad de las CD estimuladas con TSLP/IL- 50 para inducir la producción por los linfocitos T CD4 no expuestos previamente niveles altos de IL-4, IL-13 y TNF- alfa y bajos de IFN-gamma se confirmó mediante tinción de citocinas intracelulares. Por tanto, las CD-
55
60
65

TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) indujeron la producción por los linfocitos T CD4 no expuestos previamente de un único grupo de citocinas que es distinto de un perfil TH1 (IFN-gamma) o un perfil TH2 clásico (IL-4, IL-5 e IL-10). Los linfocitos T CD4 activados por las CD estimuladas con TSLP/IL-50 produjeron los niveles más altos de TNF-alfa, una de las citocinas proinflamatorias más potentes cuando se comparó con los linfocitos T CD4 activados respectivamente con CD-medio, IL-7-CD, CD40L-CD o LPS-CD. Por el contrario, las CD estimuladas con TSLP/IL-50 parecían inhibir la producción por los linfocitos T CD4+ de IL-10, una potente citocina antiinflamatoria (véase, por ejemplo, Moore y col., (2001) *Annu Rev Immunol* 19:683-765) así como IFN-gamma, una citocina TH1 que puede producir inhibición cruzada de la respuesta THD (Abbas, y col., (1996) *Nature* 383:787-793). Por tanto, las CD estimuladas con TSLP/IL-50 inducen una sólida inflamación alérgica TH2 estimulando los linfocitos T CD4+ no expuestos previamente para que produzcan IL-4, IL-5 e IL-13, en presencia de una fuerte citocina proinflamatoria TNF-alfa y en ausencia de dos inhibidores fisiológicos de la inflamación Th2, IL-10 e IFN-gamma. Además, las CD estimuladas con TSLP/IL-50 inducen potencian adicionalmente la inflamación mediada por TH2 produciendo quimiocinas tales como TARC y MDC, que, preferentemente, reclutan células TH2 en los tejidos inflamados originales (véase, por ejemplo, Imai y col., (1999) *Int. Immunol.* 11:81-88; Andrew y col., (1998) *J. Immunol.* 161:5027-5038; Andrew y col., (2001) *J. Immunol.* 166:103-111; Vestergaard y col., (2000) *J. Invest. Dermatol.* 115:640-646; y Vestergaard y col., (1999) *J. Clin. Invest.* 104:1097-1105).

V. Expresión de TSLP/IL-50.

A. Células estromales.

Para entender más la biología y la patofisiología de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1), la expresión del ARNm de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) se analizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real Taqman® en un panel de bibliotecas de ADNc de diferentes células o líneas celulares primarias y un panel de células primarias clasificadas mediante FACAS (pureza celular más de 99 %). La expresión de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) no se encontró en la mayoría de los tipos de células hematopoyéticas, incluidos los linfocitos T, los linfocitos T, las células NK, los granulocitos, los macrófagos, las subpoblaciones de monocitos y las subpoblaciones de CD. Es interesante el hecho de que los mastocitos activados por anticuerpos monoclonales con reticulación con receptores de IgE de alta afinidad expresan niveles muy altos de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1). Se encontró que la hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) estaba muy expresada por células estromales primarias humanas cultivadas tales como queratinocitos cutáneos, células epiteliales, células de músculo liso y fibroblastos pulmonares. Las células de músculo liso bronquial y los queratinocitos cutáneos activados, respectivamente, por IL-4, IL-13 y TNF-alfa, o TNF-alfa y IL-1beta parecen expresar más TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) cuando se comparó con controles solo con medio. No se encontró expresión de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) en células endoteliales. Por tanto, el ARNm de hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) se expresa principalmente en la mayoría de los tipos de células estromales y mastocitos, pero no en la mayoría de los tipos de células hematopoyéticas y células endoteliales.

Las células primarias que consisten en células de músculo liso bronquial (BSMC), fibroblastos pulmonares humanos normales (NHLF), queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK) y la línea celular de fibroblastos pulmonares (MRC5) se sembraron a $0,5 \times 10^6$ células en placas de cultivo tisular de seis pocillos. Las citocinas o combinaciones de citocinas se añadieron a las concentraciones indicadas seguidas por incubación durante 8 horas a 37 °C.

La expresión de ARNm de TSLP/IL-50 por las células de músculo liso bronquial humano (BSMC) expuestas a varias citocinas se evaluó mediante Taqman® y ELISA tras el tratamiento de células con varias citocinas, como se describe en Soumelis, y col., (2002) *Nature Immunol.* 3:673-680; Reche, y col., (2001) *J. Immunol.* 167:336-343). La expresión de los niveles de ARNm se ajustó como unidades relativas a la expresión de ARN 18s. Las células se trataron con solo medio, IL-1-alfa, IL-1beta, TNF-alfa, o la combinación de IL-1 beta y TNF-alfa, a concentraciones de 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, or 10 ng/ml en distintas mezclas de incubación. Los resultados del ELISA mostraron patrones similares en los que la combinación de IL-1 beta y TNF-alfa produjo la expresión más elevada de TSLP/IL-50 en BSMC. Los resultados de los Taqman y ELISA se resumen en la Tabla 1A.

La producción de IL-8 de las células estromales se usó como control (Tabla 1B). Una comparación en las cuatro líneas celulares analizó las diferencias reveladas en tendencias en la expresión de TSLP-IL-50 y la expresión de IL-8, lo que indica que los mecanismos que conducen a la expresión de TSLP-IL-50 y de IL-8 no son idénticos.

Tabla 1A. Expresión de ARNm de TSLP-IL-50 y proteína de células estromales. TRATAMIENTO (ND; no determinado)

| Células | Técnica | IL-1 alfa | IL-1 beta | TNF-alfa | IL-1 beta + TNF-alfa |
|---------|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| BSMC | Taqman | 321×10^{17} | 418×10^{17} | 858×10^{17} | 927×10^{17} |
| | ELISA (ng/ml) | 0,73 | 0,16 | 0,13 | 0,90 |
| NHLF | Taqman | 18×10^{17} | ND | ND | 21×10^{17} |
| | ELISA (ng/ml) | 0,06 | ND | ND | 0,10 |
| NHEK | Taqman | 12×10^{17} | ND | ND | 10×10^{17} |
| | ELISA (ng/ml) | 0,012 | ND | ND | 0,017 |

(continuación)

| Células | Técnica | IL-1 alfa | IL-1 beta | TNF-alfa | IL-1 beta + TNF-alfa |
|---------|---------------|----------------------|-----------|----------|-----------------------|
| MRC5 | Taqman | 54 x 10 ⁷ | ND | ND | 130 x 10 ⁷ |
| | ELISA (ng/ml) | 0,17 | ND | ND | 0,09 |

Tabla 1B. Expresión de ARNm de IL-8 y proteína de células estromales. TRATAMIENTO (ND; no determinado)

| Células | Técnica | IL-1 alfa | IL-1 beta | TNF-alfa | IL-1 beta + TNF-alfa |
|---------|---------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| BSMC | Taqman | 730 x 10 ⁴ | 292 x 10 ⁴ | 118 x 10 ⁴ | 1331 x 10 ⁴ |
| | ELISA (ng/ml) | 16 | 32 | 14 | 31 |
| NHLF | Taqman | 340 x 10 ⁴ | ND | ND | 345 X 10 ⁴ |
| | ELISA (ng/ml) | 41 | ND | ND | 36 |
| NHEK | Taqman | 2,6 x 10 ⁴ | ND | ND | 5,2 x 10 ⁴ |
| | ELISA (ng/ml) | 0 | ND | ND | 1,1 |
| MRC5 | Taqman | 156 x 10 ⁴ | ND | ND | 411 x 10 ⁴ |
| | ELISA (ng/ml) | 104 | ND | ND | 36 |

- 5 Mediante pruebas distintas se demostró que el tratamiento con IL-13 (25 ng/ml; 8 h) estimulaba los fibroblastos pulmonares humanos normales (NHLF) y los fibroblastos dérmicos humanos normales para que expresaran TSLP/IL-50, mientras que el tratamiento con IL-17 (25 ng/ml; 8 h) provocaba la expresión de TSLP/IL-50 en células SMC y fibroblastos dérmicos humanos normales. La expresión en respuesta a la IL-13 o la IL-17 no se detectó en, por ejemplo, los queratinocitos epidérmicos humanos normales.

10

B. Amígdalas inflamadas.

- Para determinar si los tejidos humanos inflamados, como las amígdalas, expresan la proteína hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) se investigó la inmunohistología. Las muestras se tiñeron usando el mAb 6NE0112F3, que reconoce específicamente TSLP/IL-50. Las amígdalas humanas contienen epitelio de las criptas, que reviste las criptas y que con frecuencia alojan virus y bacterias y representa los puntos de entrada de antígenos e inflamación constitutiva, y epitelio escamoso, que reviste la superficie de las amígdalas. Entre las cinco muestras de amígdalas diferentes se encontró que la hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) se expresaba constitutivamente en las células epiteliales de las criptas, que están en contacto estrecho con los linfocitos CD-LAMP y células dendríticas activadas. Es interesante el hecho de que en todas las muestras de amígdalas, solo se encontraron algunos focos pequeños de expresión de hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) dentro de la parte apical del epitelio escamoso. La expresión de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) se asoció con la infiltración de CD activadas positivas CD-LAMP y la pérdida concurrente de células de Langerhans positivas a langerina dentro del epitelio escamoso. La hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) contribuye a la inflamación constitutiva dentro del epitelio de la cripta y la inflamación esporádica dentro del epitelio escamoso.

25

C. Queratinocitos en la dermatitis atópica.

- Para investigar si la expresión de hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) estaba asociada con la inflamación alérgica de tipo TH2 in vivo se analizó la expresión de la proteína hTSLP/IL-50 en lesiones cutáneas, incluida dermatitis atópica (una enfermedad alérgica mediada por TH2), dermatitis de contacto inducida por níquel (una enfermedad alérgica mediada por linfocitos T CD8+ productores de IFN-gamma) y lupus eritematoso diseminado (una enfermedad mediada por TH1). Aunque no se detectó hTSLP/IL-50 en piel normal y en piel no dañada de dermatitis atópica, se encontró una expresión elevada de hTSLP/IL-50 en queratinocitos de dermatitis atópica aguda (4 pacientes) y crónica (6 pacientes). La expresión de hTSLP/IL-50 se encontró principalmente en queratinocitos de las capas apicales de la epidermis, que varía desde focos pequeños a toda el área apical en la dermatitis atópica tanto aguda como crónica. No se encontró hTSLP/IL-50 en lesiones cutáneas de dermatitis de contacto por alergia inducida por níquel y lupus eritematoso diseminado.

VI. Migración y activación de células de Langerhans

40

- Para investigar si la expresión de hTSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) en dermatitis atópica se asocia con la activación de CD, la hTSLP/IL-50 se tiñó junto con langerina (un marcador de células de Langerhans) o C—LAMP (un marcador de la activación de las CD) mediante inmunohistología doble. En piel normal, o piel no dañada de dermatitis atópica, se encontraron muchas células de Langerhans positivas a langerina únicamente dentro de la epidermis pero no en la dermis, y no se encontraron CD CD-LAMP+ ni en la epidermis ni en la dermis. La fuerte expresión de hTSLP/IL-50 en la dermatitis atópica se asoció con la desaparición de las células de Langerhans positivas a langerina dentro de la epidermis y la aparición simultánea de muchas CD CD-LAMP+ en la dermis. Muchas de las CD CD-LAMP+ en la dermis expresan langerina, lo que muestra que las células de Langerhans de la epidermis se activan y migran a la dermis. Por tanto, la expresión de hTSLP/IL-50 por los queratinocitos de la dermatitis atópica contribuye directamente a la activación de las células de Langerhans, que migran a los ganglios linfáticos drenantes y provocan respuestas TH2 específicas de alérgeno.

50

VII. Expresión de TSLP/IL-50 por células humanas.

La expresión de TSLP/IL-50 se determinó mediante Taqman®, como se ha descrito anteriormente. La expresión relativa de TSLP/IL-50 en las células indicadas fue: Fibroblastos pulmonares cultivados (++++); músculo liso bronquial cultivado (++++); células estromales de la próstata (++) ; células estromales de mama (+); células epiteliales de mama (+); hepatofibroblastos (+); queratinocitos cutáneos (+).

La expresión de TSLP/IL-50 también se determinó mediante procedimientos histológicos. Las células epiteliales tímicas se tiñeron con anticuerpo anti-TSLP/IL-50 marcado, como se describe en Soumelis, y col., anteriormente. La TSLP/IL-50 no se detectó en queratinocitos de piel normal y en piel no dañada de dermatitis atópica, aunque se encontró una expresión elevada en queratinocitos de dermatitis atópica aguda y crónica. En la piel normal, no se encontró expresión en las glándulas sudoríparas, glándulas ecrinas y folículos pilosos. La expresión de TSLP/IL-50 también se observó en células epiteliales tímicas (corpúsculos de Hassal) determinado mediante histología.

VIII. CD tratadas con hTSLP/IL-50 alogénicas y autólogas inducen proliferación de linfocitos T CD4+ no expuestos previamente

Los linfocitos T CD4+ no expuestos previamente se expusieron a células dendríticas alogénicas preparadas según una de cinco concisiones de prueba diferentes seguidos de la evaluación de la proliferación de los linfocitos T. Las cinco condiciones se describen en la Tabla 2. La proliferación se determinó mediante ensayos de incorporación de ³H-timidina. En reacciones alogénicas, las CD tratadas con TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) produjeron el mayor incremento de proliferación de linfocitos T, mientras que las CD tratadas con otros agentes dieron como resultados menos o mucha menos proliferación de linfocitos T.

Se analizaron las interacciones celulares autólogas, en las que las células dendríticas CD 11c+ y los linfocitos T CD4+ procedían del mismo donante humano (Tabla 2). De nuevo, el uso de CD tratadas con TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) produjeron el mayor incremento de proliferación de linfocitos T, mientras que otras preparaciones de CD produjeron menores niveles de proliferación de linfocitos T.

Tabla 2

| Incremento de la proliferación de los linfocitos T CD4+ con reacciones alogénicas y autólogas. | | |
|--|--|-----------|
| CONDICIÓN DE LA PRUEBA | Incremento del número de linfocitos T CD4+ | |
| | ALOGÉNICAS | AUTÓLOGAS |
| 1. Células dendríticas (CD) tratadas con TSLP/50 | 8,5 veces | 5,5 veces |
| 2. Lipopolisacárido (LPS) | 3,6 | 1,0 |
| 3. CD tratadas con CD40L | 3,3 | 1,8 |
| 4. CD tratadas con IL-7 | 1,7 | 1,3 |
| 5. CD tratadas con medio | 1,0 | 1,0 |

IX. Las CD tratadas con TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) estimulan la proliferación de linfocitos T CD4+ no expuestos previamente.

Las CD activadas con TSLP/IL-50 se mezclaron con linfocitos T CD4+ no expuestos previamente autólogos, seguido de una evaluación del perfil de la subespecie del receptor de linfocitos T en el grupo de linfocitos T en proliferación expandidos. Las subespecies de receptor de linfocitos T analizadas fueron TCRVβ1, TCRVβ2, TCRVβ3, TCRVβ5, TCRVβ8, TCRVβ14, TCRVβ17, TCRVβ22 y TCRVβ23. Se usaron tres tipos de incubaciones control: (1) Linfocitos T sin tratar; (2) Linfocitos T tratados con IL-7; y (3) Linfocitos T tratados con CD activadas con la endotoxina B de Streptococcus. La población de linfocitos T control sin tratar contenía subespecies del receptor de células T tal como se indica: TCRVβ1 (aproximadamente 3%), TCRVβ2 (aproximadamente 8%), TCRVβ3 (aproximadamente 6%), TCRVβ5 (aproximadamente 2%), TCRVβ8 (aproximadamente 4%), TCRVβ14 (aproximadamente 2,5%), TCRVβ17 (aproximadamente 7%), TCRVβ22 (aproximadamente 2,5%), and TCRVβ23 (aproximadamente 0,2%). Los linfocitos T CD4+ no expuestos previamente tratados con CD activadas con TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) (Experimental), seguido de incubación para permitir la proliferación de los linfocitos T exhibieron un perfil de subespecie de receptores de linfocitos T que era muy similar a la encontrada con los linfocitos T no cultivados. Los similares perfiles encontrados en los linfocitos T no cultivados y en los linfocitos T tratados con CD activadas con TSLP/IL-50 demostraron que se había producido expansión policlonal de los linfocitos T. La incubación control con IL-7 (sin CD) también dio como resultado expansión policlonal de los linfocitos T, mientras que la incubación control con CD tratadas con endotoxina tuvo como resultado la expansión seleccionada de los linfocitos T portadores de TCRVβ3 y TCRVβ17.

X. La expansión de linfocitos T mediada por TSLP/IL-50 es duradera.

Las CD tratadas con TSLP/IL-50 se incubaron con linfocitos T CD4+ no expuestos previamente autólogos, seguido de la evaluación del número de células a t = 0, 6, 9, 12, 15, 18, y 21 días. Con la exposición a las CD activadas con TSLP/IL-50, el número de linfocitos T se multiplicó por 10 el día 15, seguido de un descenso del número de células a puntos temporales posteriores. Las incubaciones control usaron linfocitos T CD4+ no expuestos previamente

expuestos a CD activadas por IL-7, a CD activadas por LPS, a CD activadas por poli I:C, a CD activadas por CD40L y a CD tratadas con medio. Esencialmente todas las incubaciones control tuvieron como resultado poco o ningún incremento del número de linfocitos T, aunque se encontró un incremento por 3 veces del número de linfocitos T el día 6 con CD activadas por LPS.

XI. Alteración del fenotipo de los linfocitos T

Se determinó el fenotipo de los linfocitos T CD4+ no expuestos previamente antes y después del tratamiento con CD activadas con TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1). El fenotipo se evaluó midiendo los siguientes marcadores en los linfocitos T: CD45RA; CD45RO; CD25; CD62L; y CCR7.

Los linfocitos T no expuestos previamente tienen el fenotipo CD45RA+, CD45RO-, CD25-, CD62L+, y CCR7+; los linfocitos T de memoria centrales tienen el fenotipo CD45RA-, CD45RO+, CD25+/-, CD62L+, y CCR7+; y los linfocitos T de memoria efectores tienen el fenotipo CD45RA-, CD45RO+, CD25+/-, CD62L+/-, y CCR7-. Los linfocitos T CD4+ activados con CD tratadas con TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) tenían el fenotipo de los linfocitos T de memoria centrales.

Las incubaciones control revelaron que el tratamiento con linfocitos T CD4+ no expuestos previamente con IL-7, pero sin CD, tuvieron como resultado ausencia de cambios en el fenotipo. El tratamiento de linfocitos T CD4+ no expuestos previamente con CD más IL-2 tuvo como resultado linfocitos T del fenotipo CD45RA-, CD45RO+, CD25+, CD62L+, y CCR7+/-.

Los linfocitos T CD4+ no expuestos previamente fueron expuestos a CD activadas con TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1), seguido de la expansión de los linfocitos T. La población de los linfocitos T expandidos se analizó para determinar la secreción de las siguientes citocinas: IL-2, IFN-gamma, IL-10, IL-4, IL-5, y IL-13. Por tanto, los resultados demostraron una elevada secreción de IL-2, baja secreción de IL-5 e IL-13, y poca o ninguna secreción de IFN-gamma, IL-10, e IL-4. Los linfocitos T CD4+ T expandidos carecen de una función efectora inmediata.

Los linfocitos T CD4+ no expuestos previamente fueron expuestos a CD activadas con TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1), alogénica, seguido de la expansión de los linfocitos T y se evaluó la secreción de las citocinas anteriores. Los resultados demostraron una secreción elevada de IL-2, IL-4, IL-5, and IL-13, y secreción baja de IFN-gamma, lo que indica que los linfocitos T CD4+ expandidos alogénicos tenían un perfil de citocinas de tipo TH2. La expresión de las citocinas identificadas anteriormente se puede usar en la detección de reacciones autólogas o alogénicas o afecciones patológicas que implican a CPA activadas con TSLP/IL-50.

El uso de linfocitos T expandidos mediante reacción autóloga en lugar de reacción alogénica podría ser preferido terapéuticamente cuando no se desea una respuesta efectora inmediata, por ejemplo una respuesta inflamatoria.

Los linfocitos T CD4+ no expuestos previamente se exponen a CD activadas por TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) autólogas y se tratan con anti-CD3 más anti-CD28, junto con anti-IL-4 más IL-12 (reactivos conocidos que estimulan un perfil de TH1), el resultado es linfocitos T que secretan grandes cantidades de IFN-gamma, pero niveles bajos de IL-2, IL-4, IL-10 e IL-13, es decir células efectoras con un perfil TH1.

Por tanto, los linfocitos T CD4+ no expuestos previamente expuestos a CD activadas por TSLP/IL-50 autólogas pueden carecer de función efectora inmediata, pero se pueden estimular para diferenciarse en células efectoras mediante estimulación secundaria. Estos resultados indican que las CD activadas por TSLP/IL-50 autólogas pueden montar una respuesta dependiente de antígeno in vivo, por ejemplo en respuesta a un patógeno.

Los linfocitos T CD4+ no expuestos previamente se trataron durante siete días con CD activadas con TSLP/IL-50 autólogas, seguido de lavado de las células. Después se titularon las células con anti-CD3 con niveles constantes de anti-CD28, con el fin de producir la señalización del TCR. Como control, los linfocitos T CD4+ no expuestos previamente también se titularon con anti-CD3 con niveles constantes de anti-CD28. Las mezclas de incubación separadas contenían anti-CD3 a 0,0001, 0,0003, 0,001, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, o 10,0 microgramos/ml, mientras que todas las incubaciones contenían anti-CD28 a un nivel constante de 1,0 microgramos/ml. La proliferación de los linfocitos T se midió mediante incorporación de ³H-timidina. Los resultados demostraron que los linfocitos T CD4+ no expuestos previamente se estimulaban al máximo para proliferar con anti-CD28 a aproximadamente 3,0 microgramos/ml, con poca o ninguna estimulación con niveles menores de anti-CD28. Por el contrario, los linfocitos T CD4+ no expuestos previamente tratados con CD activadas por TSLP/IL-50 autólogas se estimularon al máximo para proliferar a niveles muy inferiores de anti-CD28, es decir a aproximadamente 0,1 microgramos/ml. Por tanto, los linfocitos T CD4+ expandidos con CD tratadas con TSLP/IL-50 autólogas tienen un umbral de activación reducido.

XII. Las CD activadas por TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) inducen la proliferación de varios linfocitos T CD4+.

CD activadas por TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) se incubaron con:

(1) linfocitos T CD4+ no expuestos previamente autólogos; (2) linfocitos T CD4+ de memoria centrales o (3) linfocitos T CD4+ de memoria efectores autólogos con evaluación de la proliferación de los linfocitos T mediante incorporación de ³H-timidina. Se realizaron incubaciones por separado con CD/linfocitos T a una proporción de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64. Las incubaciones control incluyeron linfocitos T solo y medio solo. Con la evaluación de la proliferación, se encontró que se producía una proliferación máxima de cada una de las tres poblaciones de linfocitos T con CD/linfocitos T a la proporción de 1:1. La proliferación de los linfocitos T no expuestos previamente fue, en general, de 1,2 a 1,8 veces mayor que la proliferación de los linfocitos T de memoria centrales, mientras que la proliferación de los linfocitos T de memoria centrales fue, en general, aproximadamente 2 veces mayor que la de los linfocitos T efectores.

Los controles incubados con cada uno de los tres tipos de linfocitos T tuvieron como resultado poca o ninguna inducción de la proliferación de linfocitos T.

XIII. Psoriasis y expresión de TSLP/IL-50.

Cada una de las muestras de piel humana normal y piel psoriásica de 10 sujetos diferentes se analizó mediante procedimientos histológicos. La tinción se realizó con anticuerpo anti-TSLP/IL-50 o con anticuerpo IgG2a control (n° cat. M68178; Pharmingen Inc., San Diego, CA), ambos marcados con peroxidasa AEC (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Se usaron anticuerpos anti-TSLP/IL-50 de dos clones diferentes, en los que los resultados de ambas fuentes de anti-TSLP/IL-50 fueron consistentes entre sí. La tinción se evaluó en queratinocitos, folículos pilosos y glándulas ecrinas. La tinción de queratinocitos en los diez sujetos normales fue negativa. La tinción de los folículos pilosos y las glándulas ecrinas en diez sujetos normales varió desde negativa a baja. La tinción de los diez sujetos psoriásicos es elevada, en la que la tinción del folículo piloso y de la glándula ecrina fue comparativamente mayor. Los resultados demostraron una asociación significativa entre la expresión de TSLP/IL-50 y la psoriasis.

Identificadores de secuencia

SEQ ID NO: 1: es lingopoyetina estromática tímica humana (hTSLP/II,-50).

SEQ ID NO: 2: es la cadena alfa de IL-7R.

SEQ ID NO: 3: es el receptor de TSLP (TSLPR).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Schering Copoation

<120> Uso de reactivos relacionados con citocinas de mamíferos

<130> DX01477K

<150> 60/353.509

<151> 01-02-2002

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 159

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

Pro Asp His Tyr Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr
210 215 220

Tyr Phe Arg Thr Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp Pro
225 230 235 240

Ile Leu Leu Thr Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser Val Ala Leu Leu
245 250 255

Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val
260 265 270

Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys
275 280 285

Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu
290 295 300

Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val
305 310 315 320

Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu
325 330 335

Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu
340 345 350

Asp Val Val Val Thr Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser
370 375 380

Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val
385 390 395 400

Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro
405 410 415

Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala
420 425 430

Gln Gly Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala
435 440 445

Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln
450 455

<211> 371
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ala Leu
370

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un antagonista de TSLP/IL-50 (SEQ ID NO: 1) o TSLP/IL-50R (SEQ ID NO: 2, 3) para su uso en el tratamiento del asma o de la dermatitis atópica; en donde el antagonista es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se unen específicamente a TSLP/IL-50 ((SEQ ID NO: 1) o a TSLP/IL-50R (SEQ ID NO: 2, 3) y en donde el antagonista inhibe las células dendríticas para cebar linfocitos naive T CD4+ para la producción de IL-4, IL-5, IL-13 y TNF-alfa.