

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 568**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/54** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2012** **PCT/EP2012/053199**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2012** **WO12113927**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2012** **E 12705692 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016** **EP 2678355**

54 Título: **Nuevos fragmentos de IL-33 superactivos y sus utilizaciones**

30 Prioridad:

**24.02.2011 FR 1151498**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.02.2017**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS) (100.0%)  
3 rue Michel Ange  
75016 Paris , FR**

72 Inventor/es:

**GIRARD, JEAN-PHILIPPE;  
CAYROL-GIRARD, CORINNE y  
LEFRANCAIS, EMMA**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 603 568 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Nuevos fragmentos de IL-33 superactivos y sus utilizaciones.

5 **Introducción**

Las citoquinas de la familia interleucina 1 (IL-1) desempeñan un papel principal en un gran número de enfermedades auto-inmunes, infecciosas e inflamatorias (Sims JE y Smith DE, *Nature Rev Immunology* 2010). La interleucina 33 (IL-33), inicialmente denominada NF-HEV, es una nueva citoquina de la familia IL-1 que comprende 270 aminoácidos (Figura 1, NP\_254274, SEC ID nº 1). Es un factor nuclear altamente expresado en las células endoteliales cuboidales (Bakkevold E. *et al.*, *American Journal Pathology* 2003). La IL-33 presenta, en su parte carboxi-terminal, unas homologías estructurales con la interleucina 1 (estructura con 12 hojas beta) (Lingel *et al.*, *Structure* 2009) y se une al receptor huérfano ST2 (IL1-R4) (Chackerian AA *et al.*, *Journal of Immunology* 2007). La IL-33 es una proteína nuclear asociada a la cromatina (Carriere V. *et al.*, *PNAS* 2007). Está expresada de manera constitutiva en las células endoteliales de los vasos sanguíneos de la mayoría de los tejidos, así como en unas células epiteliales de tejidos expuestos al entorno, como la piel, el estómago, las glándulas salivares o los pulmones (Moussion *et al.*, *PLoS ONE* 2008).

Se sabe que la IL-33 se libera en su forma entera (IL-33<sub>aa1-270</sub>), biológicamente activa, en caso de daño o de necrosis celulares. La IL-33 entera es, en efecto, capaz de unirse al receptor ST2 (Cayrol y Girard, *PNAS* 2009) y activar las células diana, en particular las células del sistema inmunitario: los linfocitos Th2, los mastocitos, las células asesinas NK e iNKT, los basófilos y los eosinófilos (para recordar, véase Liew *et al.*, *Nature Rev Immunology* 2010). La activación del receptor ST2 sobre las células diana induce, según las células, la secreción de citoquinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) y/o de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ ). Además, varios estudios recientes han mostrado la capacidad de IL-33 para reclutar unas células del sistema inmunitario, como los neutrófilos (Alves-Filho *et al.*, *Nature Medicine* 2010) sobre los sitios inflamatorios o infecciosos. Según estos resultados, la IL-33 podría por lo tanto servir de señal de peligro para alertar al sistema inmunitario después de una infección o un traumatismo de las células endoteliales o epiteliales (Moussion *et al.*, *PLoS ONE* 2008; Cayrol y Girard, *PNAS* 2009).

La IL-33 tiene un efecto protector en algunas patologías, mientras que es un factor agravante en otras. Por ejemplo, la IL-33 desempeña una función protectora en unas enfermedades infecciosas como la sepsis (Alves-Filho *et al.*, *Nature Medicine* 2010), la queratitis de *Pseudomonas* (Hazlett *et al.*, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010) o la infección por nemátodos (Humphreys *et al.*, *Journal of Immunology* 2008). Esta función protectora está también demostrada en la aterosclerosis (Miller *et al.*, *J. Exp. Med* 2008), el infarto del miocardio (Seki *et al.*, *Circ Heart Fail* 2009) la inflamación de los tejidos adiposos en caso de obesidad (Miller *et al.*, *Circ Res* 2010) y el cáncer (WO2005/079844). Estos datos sugieren que la IL-33 podría ser utilizada como agente terapéutico para estas patologías. Por el contrario, se ha demostrado que la IL-33 intensifica los efectos fisiopatológicos en otros tipos de enfermedades como la poliartritis reumatoide (Xu *et al.*, *Journal of Immunology* 2010), la inflamación de las vías aéreas de tipo alérgico, como el asma (Stolarski *et al.*, *Journal of Immunology* 2010), la fibrosis cutánea (Rankin *et al.*, *J. Immunol.* 2010) o el choque anafiláctico (Pushparaj *et al.*, *PNAS* 2008), haciendo de la IL-33 una diana terapéutica potencial para estas patologías.

Así, estos estudios han mostrado, al mismo tiempo en el hombre y en los modelos animales, que la administración *in vivo* de IL-33 podría favorecer la curación de numerosas enfermedades, en particular de las enfermedades inflamatorias crónicas, de las enfermedades de tipo alérgico, de las enfermedades cardiovasculares, de las enfermedades infecciosas, el cáncer y la enfermedad de Alzheimer (para recordar véase Liew *et al.*, *Nature Rev Immunology* 2010).

Cabe señalar que los autores de los diferentes estudios mencionados anteriormente han utilizado, para sus estudios *in vivo*, una forma truncada artificial de la IL-33 (IL-33<sub>aa112-270</sub>), que contiene el dominio de tipo "citoquina IL-1" de la IL-33 (aminoácidos 112 a 270), y que está desprovista del dominio N-terminal de la proteína entera (aminoácidos 1 a 111) (véase la figura 1A). La comunidad científica ha creído durante mucho tiempo que esta forma truncada IL-33<sub>aa112-270</sub> podía ser generada *in vivo*. En efecto, se había sugerido que una forma IL-33<sub>aa112-270</sub>, que corresponde al dominio C-terminal de tipo "Citoquina IL-1", podía ser generada tras la escisión de la IL-33 por la caspasa 1 después del residuo Ser111 (Schmitz *et al.*, *Immunity* 2005); se reconoció entonces por la comunidad científica que la maduración de la IL-33 por la caspasa 1 era posible, produciendo la forma truncada activa (IL-33<sub>aa112-270</sub>). Sin embargo, se ha establecido recientemente que la escisión por las caspasas no da como resultado una activación, sino una inactivación de la proteína, ya que estas proteasas escinden la proteína IL-33 en el dominio de tipo citoquina IL-1, entre las 4ª y 5ª hojas  $\beta$ , a nivel de la secuencia DGVD (aa175-178). La escisión de la IL-33 por las caspasas apoptóticas podría ser un mecanismo seleccionado para eliminar las actividades pro-inflamatorias de IL-33 durante la apoptosis, un proceso que no conlleva ninguna inflamación *in vivo*.

Schmitz *et al.* (*Immunity* 2005) divulgan que la IL-33 estaría supuestamente escindida por la caspasa 1 después del residuo Ser111 *in vivo*, produciendo así la forma escindida IL-33<sub>aa112-270</sub> y sugieren que esta forma escindida tiene una acción biológica sobre el receptor de IL-1 (ST2).

En un resultado más importante aún, se ha podido demostrar que la forma madura IL-33<sub>aa112-270</sub>, utilizada en numerosos estudios, no estaba generada por la acción de la caspasa 1 *in vitro* y, por lo tanto, a fortiori, *in vivo*. Esta forma truncada IL-33<sub>aa112-270</sub> no existe, por lo tanto, *in vivo* (Cayrol y Girard, PNAS 2009, Lüthi *et al.*, Immunity 2009; Talabot-Ayer *et al.*, J. Biol. Chem. 2009; Ali *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 2010), y por lo tanto no se ha encontrado nunca en el sistema inmunitario humano.

Más recientemente, Cayrol y Girard (PNAS 2009), y Lüthi *et al.* (Immunity 2009) (así como la solicitud WO 2008/132709, la cual se basa en los resultados experimentales publicados en Lüthi *et al.*) describen que la escisión de IL-33 no tiene lugar después de Ser111, sino después del residuo Asp178 (D2), y que esta escisión genera unos fragmentos de IL-33 que son inactivos *in vitro* e *in vivo*. Estos documentos sugieren que esta escisión por las caspasas 3 y 7 permite en realidad controlar *in vivo* la actividad de IL-33 en las células apoptóticas.

Su utilización en terapia humana podría, por lo tanto, plantear unos problemas importantes, en particular de inmunogenicidad. La utilización de una forma natural de IL-33 es preferible para las aplicaciones en terapia humana. Sin embargo, hasta ahora, no ha sido posible expresar la proteína IL-33 entera en cantidades compatibles con la realización de ensayos *in vivo*, y aún menos con la producción industrial de un medicamento bioterapéutico.

Por lo tanto, es conveniente identificar una forma activa de IL-33 humana que, i) sea activa, por lo menos tanto, incluso más activa que la forma entera, ii) sea generada de manera natural (y por lo tanto *a priori* poco o nada inmunógena), y iii) pueda ser producida a gran escala en forma recombinante (por miligramos, incluso por gramos), con el fin de ser utilizada como tratamiento a medio y largo plazo en el ser humano.

Ahora bien, hasta ahora no se había identificado ninguna proteasa que pudiera inducir la maduración de la IL-33 humana de manera natural, en una forma más activa que la forma entera.

Los presentes inventores han respondido a esta necesidad, demostrando que la IL-33 entera es escindida de manera natural por tres proteasas de neutrófilos, la Cathepsina G, la elastasa y la proteinasa 3 humanas. Estas proteasas liberan unos fragmentos carboxi-terminales de tamaños superiores a la forma truncada artificial IL-33<sub>aa112-270</sub>, teniendo dichos fragmentos una actividad biológica superior, tanto *in vitro* como *in vivo*, a la de la forma entera IL-33<sub>aa1-270</sub>. A diferencia de la forma IL-33<sub>aa1-270</sub>, estos nuevos fragmentos de IL-33 están fácilmente expresados en las células bacterianas, como *E. Coli*. Tienen la ventaja de ser obtenidos de manera natural, y son más activos *in vivo* que la forma truncada artificial de IL-33 utilizada hasta ahora (IL-33<sub>aa112-270</sub>) (véase el ejemplo d) siguiente).

Debido a sus propiedades, estos nuevos fragmentos de IL-33 podrían ser producidos en las industrias de biotecnología con el fin de ser utilizados, en particular, en la salud humana (tratamientos de enfermedades humanas en las que IL-33 tiene un efecto protector) o para la investigación científica.

#### Leyendas de las figuras

La figura 1 A describe la estructura primaria de la proteína IL-33 humana entera. Se indican los dominios funcionales (unión a la cromatina, citoquina IL-1). La figura 1 B presenta los sitios de escisión por las proteasas de neutrófilo Cathepsina G (Cat G), Elastasa 2 (Elastasa) y Proteasa 3 (PR3) secuencia arriba del dominio C-terminal de tipo "citoquina IL-1", así como los fragmentos liberados por la acción de estas proteasas (fragmentos IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub>).

La figura 2 A presenta los resultados de las transferencias western demostrando que la interleucina IL-33 humana entera es escindida *in vitro* por las proteasas recombinantes Cathepsina G (Cat G), Elastasa 2 (Elastasa) y Proteasa 3 (PR3), al contrario que la forma truncada IL-33<sub>aa112-270</sub>, que permanece intacta en presencia de estas proteasas (Figura 2B). La figura 2C presenta los resultados que demuestran que la IL-33 humana es el sustrato de estas mismas proteasas humanas extraídas directamente de neutrófilos humanos *ex vivo*. La figura 2D muestra que los fragmentos IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub> no son liberados por las proteasas de neutrófilos cuando los sitios de escisión correspondientes son mutados.

La figura 3 A presenta el análisis cuantitativo de las proteínas recombinantes IL-33<sub>aa1-270</sub>, IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub> por transferencia western, mientras que la figura 3 B presenta la actividad de estas diferentes proteínas *in vitro* sobre la secreción de IL-6 por unas células mastocitarias MC/9.

La figura 4 presenta los perfiles de expresión de los tres fragmentos polipeptídicos de la invención, IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub> obtenidos por vía recombinante en unas células bacterianas (el vector utilizado es el vector pET15b y la cepa de *E. coli* es la cepa BL21, para más detalles véase el ejemplo c) siguiente). Se han obtenido varios miligramos de proteína recombinante purificada a partir de un litro de cultivo de *E. coli* (véase la tabla).

La figura 5 presenta los resultados obtenidos *in vivo* con los fragmentos polipeptídicos de la invención. Se han extraído los bazo de ratones que han recibido diariamente una inyección de estos fragmentos durante 7 días (A)

y se ha analizado su yeyuno por marcado PAS-alcian blue (B). El número de granulocitos en la sangre se ha medido al final de los 7 días (C).

### Descripción de la invención

El objetivo de la presente invención es identificar un fragmento activo de IL-33 humana (por lo menos tanto, incluso más activo que la forma entera, y preferentemente por lo menos tan activo como IL-33<sub>aa112-270</sub>), que corresponda a una forma natural (y por lo tanto a priori poco o nada inmunógena) y que pueda ser producido a gran escala en forma recombinante (del orden del miligramo, incluso del gramo) y por lo tanto utilizable en unas aplicaciones en salud (tratamientos a medio y largo plazo en el ser humano) y en biotecnología (investigación científica).

Los neutrófilos son los primeros leucocitos circulantes que migran sobre el sitio de la inflamación y constituyen la primera línea de defensa contra los agentes patógenos. Además de su función de fagocitos, pueden asegurar una defensa innata liberando unas proteínas granulares, en particular las proteasas Catepsina G, Elastasa 2 o Proteinasa 3, en el medio extracelular.

Los presentes inventores han podido demostrar, por primera vez, que la acción de la Catepsina G o de la proteinasa 3 de los leucocitos libera los fragmentos polipeptídicos IL-33<sub>aa95-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub> del dominio N-terminal de IL-33 humana. La acción de la elastasa 2 de los neutrófilos o de la proteasa 3 libera, por su parte, el fragmento polipeptídico IL-33<sub>aa99-270</sub> del dominio N-terminal de IL-33 humana. Los sitios de escisión de estas proteasas han podido ser determinados muy precisamente, poniendo así en evidencia tres nuevos fragmentos de IL-33, IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub>, que no habían sido nunca identificados hasta ahora (véanse las figuras 1B y 2). Al diferencia del fragmento IL-33<sub>aa112-270</sub> utilizado hasta ahora, estos fragmentos resultan de la escisión natural de la IL-33 entera por las proteasas de los neutrófilos en el hombre, y son por lo tanto fisiológicos.

De manera sorprendente, estos fragmentos de IL-33 (IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub>) presentan *in vitro* e *in vivo* una actividad biológica superior a la forma entera de IL-33 humana y/o a la forma truncada IL-33<sub>aa112-270</sub> utilizada hasta ahora: en efecto, estos tres nuevos fragmentos de IL-33 inducen *in vitro* la secreción de cuatro veces más de IL-6 que la forma entera de IL-33 en una línea mastocitaria murina MC/9 (figura 3B) y una inyección diaria de péptidos a unos ratones durante 7 días conlleva una reacción inflamatoria que se traduce por una duplicación del peso del bazo después de 7 días, y un aumento significativo del número de granulocitos (principalmente unos neutrófilos) en la sangre de los ratones, con respecto a la forma truncada IL-33<sub>aa112-270</sub> (véase el ejemplo d) siguiente).

Finalmente, al contrario que la forma entera de IL-33 humana, estos fragmentos polipeptídicos de IL-33 (IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub>) se expresan fácilmente por las células clásicamente utilizadas para la producción de proteínas recombinantes (células *E. coli* por ejemplo), y se obtienen unos porcentajes de 9 mg por litro de cultivo celular (véase el ejemplo c) siguiente).

En un primer aspecto, la presente invención se refiere por lo tanto a un fragmento polipeptídico aislado de la interleucina 33 humana (hIL-33), biológicamente activo, seleccionado de entre los fragmentos que tienen por secuencia los aminoácidos 95 a 270 (SEC ID nº 2), 99 a 270 (SEC ID nº 3) o 109 a 270 (SEC ID nº 4) de la interleucina 33 humana (hIL-33), siendo dichos fragmentos unos productos naturales de escisión de hIL-33 por lo menos por una proteasa de los neutrófilos humanos.

En un modo de realización particular de la invención, dicha proteasa de los neutrófilos humanos se selecciona de entre el grupo constituido por: la Catepsina G, la proteinasa 3 de leucocitos, y la elastasa 2 de neutrófilos.

Más precisamente, la presente invención tiene como objetivo el fragmento polipeptídico IL-33<sub>aa95-270</sub> que tiene la secuencia SEC ID nº 2, que es un producto natural de escisión de hIL-33 por la Catepsina G y la proteinasa 3 de leucocitos, teniendo el fragmento polipeptídico IL-33<sub>aa99-270</sub> la secuencia SEC ID nº 3, que es un producto natural de escisión de hIL-33 por la proteinasa 3 de leucocitos y la elastasa 2 de neutrófilos, y finalmente el fragmento polipeptídico IL-33<sub>aa109-270</sub> que tiene la secuencia SEC ID nº 4, que es un producto natural de escisión de hIL-33 por la Catepsina G y la proteinasa 3 de leucocitos.

Estos tres fragmentos resultan por lo tanto de la escisión de IL-33 humana entera por unas proteasas naturalmente presentes en el hombre, y son por lo tanto naturales. Pueden ser generados naturalmente en el hombre y no son a priori inmunógenos. En otras palabras, estos fragmentos pueden ser reconocidos como unos antígenos propios por el sistema inmunitario humano, y no inician por lo tanto, cuando se inyectan en unos seres humanos, una reacción inmunitaria dirigida a su propio rechazo. Por lo tanto son tolerados por los individuos en los que se inyectan, a corto, medio y largo plazo (típicamente, durante toda la vida del paciente). Se recuerda aquí que la no-inmunogenicidad del fragmento polipeptídico de la invención no debilita en modo alguno su facultad para estimular y reclutar las células del sistema inmunitario (linfocitos Th2, mastocitos, NK y iNKT, basófilos y eosinófilos) del individuo en el que se inyecta, al igual de la interleucina IL-33 entera.

Se entiende por "Catepsina G" en el sentido de la presente invención una enzima que pertenece a la familia de las

proteasas S1 (o peptidasas S1). Su actividad enzimática está preferentemente caracterizada por el número EC 3.4.21.20. Es capaz, en particular, de escindir unas quimiocinas como CXCL5 (Nufer O. *et al.*, Biochemistry 1999) o unos receptores membranaarios como PAR4 (Sambrano G.R. *et al.*, J. Biol. Chem. 2000). Posee una triada catalítica (serina, histidina y aspartato), característica de las proteasas de serina de los mamíferos. La compilación de diferentes datos ha permitido definir unos sitios de escisión preferidos (Burster T., *et al.* Molecular Immunology 2010). De manera característica, se encuentran frecuentemente unos residuos aromáticos (Phe, Tyr) o cargados (Lys, Arg) en la posición P1 (posición del aminoácido situado justo secuencia arriba de la unión escindida (Korkmaz, B. *et al.*, Pharmacological Reviews 2010). Esta enzima se encuentra preferentemente en los gránulos azurófilos de los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos. Participa en la destrucción y en la digestión de los patógenos presentes en los tejidos conjuntivos o en los sitios de inflamación (Kargi H.A. *et al.*, J. Histochem. Cytochem 1990). En el hombre, está codificada por el gen CTSG. Tiene preferentemente la secuencia descrita bajo el número de acceso HUMCAPG J04990.1. De manera aún más preferida, tiene la secuencia SEC ID nº 6. Los presentes inventores han podido demostrar, por primer vez, que la acción de la Catepsina G de la secuencia SEC ID nº 6 libera los fragmentos polipeptídicos IL-33<sub>aa95-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub> del dominio N-terminal de IL-33 humana.

Se entiende por "proteínasa 3 de leucocitos" en el sentido de la presente invención, la mieloblastina, la proteína 4 de neutrófilos, la proteína 7 de los gránulos azurófilos, o también el autoantígeno de la granulomatosa de Wegener. Se denominada "proteínasa 3" (PRTN3) en el ámbito de la presente solicitud. Su actividad enzimática se caracteriza preferentemente por el número EC 3.4.21.76. Esta enzima, que pertenece a la familia de las proteasas S1, es capaz de hidrolizar unas proteínas, y en particular la elastina (Rao N.V. *et al.*, PNAS 1991). Los sustratos preferidos de la PR3 poseen, en la posición P1, unos aminoácidos hidrófobos (Val, Cys, Ala, Met, Leu, Ser) (Korkmaz *et al.*, Pharmacological Reviews 2010) o polares (Asn, Cys, Glu, Gln, Ser, Thr, Trp, Tyr) (Hajjar E *et al.*, FEBS Letters 2007). Preferentemente, la proteína 3 utilizada en la invención es la enzima humana, por ejemplo la referenciada bajo el número de acceso NCBI NP\_002768.3. De manera aún más preferida, la proteína 3 utilizada en la invención tiene la secuencia SEC ID nº 7. Los presentes inventores han podido demostrar que la acción de la proteasa 3 de la secuencia SEC ID nº 7 sobre IL-33 humana libera los fragmentos polipeptídicos IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa109-270</sub> e IL-33<sub>aa99-270</sub>.

Se entiende por "elastasa 2 de los neutrófilos" en el sentido de la presente invención, la medulasina, o también la elastasa de leucocitos, codificada por el gen ELANE. Se denominada "elastasa 2" en el ámbito de la presente solicitud. Su actividad enzimática se caracteriza preferentemente por el número EC 3.4.21.37. Esta enzima es capaz de escindir la elastina (Bieth J.G., J. Soc. Biol. 2001). En lo referente a los sitios de escisión específicos, se señala una preferencia de pequeños restos hidrófobos en la posición P1 (Val, Cys, Ala, Met, Leu, Ser) (Korkmaz *et al.*, 2010; Hajjar E. *et al.*, 2007). Preferentemente, la elastasa 2 utilizada en la presente invención es la enzima humana, por ejemplo la proteína referenciada bajo el número de acceso NCBI NP\_001963.1. De manera aún más preferida, la elastasa 2 de la invención tiene por secuencia SEC ID nº 8. Los presentes inventores han podido demostrar, por primer vez, que la acción de la elastasa 2 de los neutrófilos sobre IL-33 humana libera el fragmento polipeptídico IL-33<sub>aa99-270</sub>.

Estas tres proteasas (Catepsina G, proteína 3 y elastasa 2) pertenecen a la familia de las "proteasas de serina de neutrófilos". En un modo de realización particular, la Catepsina G mencionada anteriormente tiene la secuencia SEC ID nº 6, la proteína 3 tiene la secuencia SEC ID nº 7, y la elastasa 2 tiene la secuencia SEC ID nº 8. También se pueden considerar los homólogos de estas proteasas. Se entiende aquí por "homólogos" las proteasas que tienen una secuencia idéntica en por lo menos un 80%, preferentemente en un 85%, preferentemente en un 87%, preferentemente en un 90%, preferentemente en un 92%, preferentemente en un 95%, preferentemente en un 98% y de manera muy preferida en un 99% a las SEC ID nº 6, SEC ID nº 7 y SEC ID nº 8 y que conservan las actividades enzimáticas de las proteasas elastasa 2, proteína 3 y Catepsina G correspondientes, tales como se han definido anteriormente.

En el sentido de la presente invención, la expresión "interleucina 33 humana" (IL-33) designa una citoquina de la familia IL-1. Se han identificado tres isoformas de IL-33 en el hombre: se trata de la isoforma 1 (NP\_254274), de la isoforma 2 (NP\_001186569), y de la isoforma 3 (NP\_001186570). La IL-33 definida en la invención es la isoforma 1 de IL-33, que comprende 270 aminoácidos, e identificada bajo el número de acceso NP\_254274. En un modo de realización más particular, la IL-33 de la invención tiene la secuencia SEC ID nº 1.

La expresión "fragmento polipeptídico" designa, en la presente invención, una cadena de aminoácidos enlazados por unos enlaces peptídicos, que comprenden por lo menos 50 aminoácidos, preferentemente por lo menos 100 aminoácidos y como máximo 250 aminoácidos, preferentemente entre aproximadamente 150 aminoácidos y 180 aminoácidos, de manera aún más preferida entre aproximadamente 160 aminoácidos y 175 aminoácidos.

Cuando se utiliza a continuación la expresión "los fragmentos polipeptídicos", designa cada una de los tres fragmentos polipeptídicos IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub> tales como se han definido anteriormente.

Los fragmentos polipeptídicos de la invención son biológicamente activos, es decir que poseen una actividad biológica *in vitro* y/o *in vivo*, por ejemplo sobre la activación y/o el reclutamiento de las células del sistema inmunitario.

Preferentemente, los fragmentos polipeptídicos de la invención presentan por lo menos una (incluso varias) actividades biológicas mejoradas con respecto a la forma entera IL-33 y/o con respecto a la forma truncada de IL-33 ya conocida que tiene la secuencia SEC ID nº 5 (IL-33<sub>aa112-270</sub>). Esta actividad biológica mejorada puede ser, por ejemplo, la activación y/o el reclutamiento de las células del sistema inmunitario. Así, en un modo de realización particular, cada uno de los fragmentos polipeptídicos de la invención tiene una actividad de estimulación de las células del sistema inmunitario aumentada con respecto a la forma entera de IL-33 humana. Según otro modo de realización particular, cada uno de los fragmentos polipeptídicos de la invención tiene una actividad de reclutamiento de las células del sistema inmunitario aumentada con respecto a la forma truncada de IL-33 humana que tiene la secuencia SEC ID nº 5 (IL-33<sub>aa112-270</sub>). Preferentemente, dichas células del sistema inmunitario son los linfocitos Th2, los mastocitos, los mastocitos, las células asesinas NK y iNKT, los basófilos y los eosinófilos.

Las propiedades de estimulación de las células del sistema inmunitario pueden ser evaluadas en particular *in vitro*, por ejemplo poniendo uno de dichos fragmentos en contacto con células del sistema inmunitario y midiendo su estado de estimulación. En este ensayo, las células del sistema inmunitario son preferentemente unos basófilos o unas células mastocitarias, cuyo estado de estimulación puede ser estimado, por ejemplo, midiendo la cantidad de citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-18, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 o GM-CSF, que segregan (Reen D.J., Methods Mol Biol. 1994). La medición de la cantidad de citoquinas segregadas puede realizarse mediante numerosas técnicas bien conocidas por el experto en la técnica, y en particular mediante la técnica de ELISA. A continuación se presenta un ejemplo de tal ensayo (véase el ejemplo b)).

En un modo de realización preferido, los fragmentos polipeptídicos de la invención presentan una mejor actividad *in vitro* de estimulación de las células del sistema inmunitario con respecto a la interleucina 33 humana (hIL-33) nativa, y son capaces de estimular la secreción de por lo menos una de estas citoquinas con una relación (por ejemplo definida como la cantidad de citoquina segregada por dichas células en presencia del fragmento de la invención / cantidad de citoquina segregada por las mismas células, en presencia de IL-33 en forma entera) preferentemente de por lo menos dos, de manera aún más preferida de por lo menos tres, y de manera preferida entre todas de por lo menos cuatro, con respecto a la forma entera de IL-33 humana de SEC ID nº 1.

Es asimismo posible evaluar *in vitro* el enlace de estos fragmentos polipeptídicos al receptor ST2, con el fin de verificar que este último está bien estimulado por estos fragmentos.

Por otro lado, las propiedades de reclutamiento de células del sistema inmunitario pueden ser evaluadas *in vivo*, inyectando uno de los fragmentos peptídicos de IL-33 en la cavidad peritoneal durante 6 a 7 días y analizando la celularidad (eosinófilos, neutrófilos, granulocitos) en el bazo o el suero. Se pueden observar también unos cambios patológicos a nivel de los pulmones (presencia de mucosa), del tracto digestivo (hiperplasia de células epiteliales y células calciformes) o del plasma (concentración incrementada de citoquinas como IL-4, IL-5) (Schmitz J. *et al.*, Immunity 2005; Lüthi A. *et al.*, Immunity 2009). Se describe a continuación tal ejemplo (véase el ejemplo d)).

En un modo de realización preferido, los fragmentos de la invención presentan una mejor actividad *in vivo* de reclutamiento de las células del sistema inmunitario con respecto a la forma truncada de IL-33 que tiene por secuencia los aminoácidos 112 a 270 (SEC ID nº 5). Más precisamente, los fragmentos de la invención son preferentemente capaces de inducir un aumento del peso del bazo y/o aumentar la celularidad en granulocitos en la sangre de los ratones de un factor de por lo menos 1,8, de manera aún más preferida de 2, con respecto a la inyección de un vehículo control (PBS), y de un factor de por lo menos 1,2, de manera aún más preferida de por lo menos 1,3, y de manera preferida entre todas, de por lo menos 1,4, con respecto a la inyección de la forma truncada de IL-33 de secuencia SEC ID nº 5 (IL-33<sub>aa112-270</sub>).

En el sentido de la presente invención, un proceso biológico tiene lugar "*in vitro*" cuando aparece fuera de un organismo animal o humano, por ejemplo en un material de laboratorio (tubo, probeta, eppendorfs, etc.), por lo tanto de manera artificial. Preferentemente, este proceso no hace intervenir ninguna célula animal o humana. Al contrario, en el sentido de la presente invención, un proceso biológico tiene lugar "*in vivo*" cuando aparece en un organismo humano o animal. En el sentido de la presente invención, un proceso biológico se califica de "*ex vivo*" cuando implica unas células humanas o animales vivas que son cultivadas fuera del organismo del cual proceden (líneas celulares o células primarias cultivadas en materiales de laboratorio).

La presente solicitud describe también los homólogos de los fragmentos que tienen por secuencia los aminoácidos 95 a 270 (SEC ID nº 2), 99 a 270 (SEC ID nº 3) o 109 a 270 (SEC ID nº 4) de la interleucina 33 humana (hIL-33).

Los "homólogos" descritos anteriormente son unos fragmentos polipeptídicos que son "homólogos" a los que tienen por secuencia las SEC ID nº 2, SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4. El término "homólogo" designa aquí un polipéptido que tiene una secuencia idéntica en por lo menos un 80%, preferentemente en un 85%, preferentemente en un 87%, preferentemente en un 90%, preferentemente en un 92%, preferentemente en un 95%, preferentemente en un 97%, preferentemente en un 98% y de manera aún más preferida en un 99% a las SEC ID nº 2, SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4 y que tienen esencialmente la o las mismas actividades biológicas que las de los fragmentos polipeptídicos correspondientes.

Preferentemente, los "homólogos" descritos en la presente solicitud no son los fragmentos de IL33 humana ya conocidos, es decir IL-33<sub>1-178</sub> e IL-33<sub>179-270</sub> de secuencia SEC ID nº 15 y SEC ID nº 16 respectivamente, no teniendo estos fragmentos ninguna actividad *in vitro* e *in vivo* (véase el documento WO 2008/132709, Cayrol and Girard, PNAS 2009, Lüthi *et al.*, Immunity 2009). Por supuesto, los "homólogos" no pueden ser, por otro lado, la forma entera de IL33, que tiene la SEC ID nº 1, ni la forma artificial de IL-33, IL-33<sub>112-270</sub>, que tiene la SEC ID nº 5.

Por "que tiene esencialmente la o las mismas actividades biológicas" o "que conserva esencialmente la o las mismas actividades biológicas", se entiende aquí que por lo menos el 90%, incluso por lo menos el 95% de por lo menos una de las actividades biológicas del fragmento polipeptídico de las SEC ID nº 2, SEC ID nº 3 o SEC ID nº 4 se conserva para el fragmento que tiene una secuencia idéntica en por lo menos un 80%, preferentemente en un 85%, y de manera aún más preferida en un 90%. Ventajosamente, esta actividad biológica es la activación de las células del sistema inmunitario y se puede medir *in vitro*, por ejemplo como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, esta actividad biológica es el reclutamiento de las células del sistema inmunitario y se puede medir *in vivo*, por ejemplo como se ha descrito anteriormente. De manera aún más preferida, los fragmentos polipeptídicos que tienen una secuencia idéntica en por lo menos un 80%, preferentemente en un 85%, y de manera aún más preferida en un 90% a las SEC ID nº 2, SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4 tienen las mismas capacidades de activación y de reclutamiento de las células del sistema inmunitario que las de los fragmentos polipeptídicos correspondientes.

Por "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de aminoácido en el sentido de la presente invención, se entiende designar un porcentaje de restos de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenido después de la mejor alineación (alineación óptima), siendo este porcentaje puramente estadístico y estando las diferencias entre las dos secuencias distribuidas al azar y sobre toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de aminoácido se realizan tradicionalmente comparando estas secuencias después de haberlas alineado de manera óptima, pudiendo dicha comparación ser realizada por segmento o por "ventana de comparación". La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede realizar, además de manualmente, mediante ciertos algoritmos de homología local (algoritmo de Smith y Waterman, de Neddleman y Wunsch o de Pearson y Lipman), mediante programas informáticos que utilizan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o también por los programas de comparación BLAST N o BLAST P).

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácido se determina comparando estas dos secuencias alineadas de manera óptima en la que la secuencia de aminoácido a comparar puede comprender unas adiciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia para una alineación óptima entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas para las cuales el resto de aminoácido es idéntico entre las dos secuencias, dividiendo este número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

Por ejemplo, se podrá utilizar el programa BLAST, "BLAST 2 secuencias" (Tatusova *et al.*, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol., 1999) disponible de la página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, siendo los parámetros utilizados los dados por defecto (en particular, los parámetros "open gap penaltie": 5, y "extension gap penaltie": 2; siendo la matriz seleccionada por ejemplo la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa), siendo el porcentaje de identidad entre las dos secuencias a comparar calculado directamente por el programa.

Por "secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos el 80%, preferentemente el 85%, preferentemente el 87%, preferentemente el 90%, preferentemente el 92%, preferentemente el 95%, preferentemente el 97%, preferentemente el 98% y de manera aún más preferida el 99% de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia", se prefieren las que presentan, con respecto a la secuencia de referencia, ciertas modificaciones, en particular una deleción, una adición o una sustitución de por lo menos un aminoácido, un truncado o un alargamiento, y que conservan la o las mismas actividades biológicas que las de los polipéptidos correspondientes. Ventajosamente, se conservan esencialmente las actividades de activación y/o de reclutamiento de las células del sistema inmunitario.

En el caso de una sustitución de uno o varios aminoácido(s) consecutivo(s) o no consecutivo(s), se prefieren las sustituciones en las que los aminoácidos sustituidos son sustituidos por unos aminoácidos equivalentes. La expresión "aminoácidos equivalentes" pretende designar aquí cualquier aminoácido susceptible de ser sustituido por uno de los aminoácidos de la estructura de base sin, no obstante, modificar esencialmente la o las actividades biológicas de los fragmentos polipeptídicos correspondientes. Ventajosamente, se conservan la actividad de activación y/o de reclutamiento de las células del sistema inmunitario. Estos aminoácidos equivalentes pueden ser determinados o bien basándose en su homología de estructura con los aminoácidos a los que sustituyen, o bien sobre unos resultados de ensayo comparativos de actividad biológica susceptibles de ser efectuados entre los diferentes fragmentos. Esta búsqueda de similitudes en una secuencia polipeptídica tiene en cuenta las sustituciones conservadoras, que son unas sustituciones de aminoácidos de la misma clase, tales como unas sustituciones de aminoácidos en las cadenas laterales no cargadas (tales como la asparagina, la glutamina, la

serina, la treonina, y la tirosina), de aminoácidos en las cadenas laterales básicas (tales como la lisina, la arginina, y la histidina), de aminoácidos en las cadenas laterales ácidas (tales como el ácido aspártico, el ácido glutámico); de aminoácidos en las cadenas laterales apolares (tales como la glicina, la alanina, la valina, la leucina, la isoleucina, la prolina, la fenilalanina, la metionina, el triptofano, y la cisteína) (Hausman RE *et al.* (2004). D.C: ASM Press). El experto en la materia determinará fácilmente las regiones del fragmento peptídico que pueden tolerar un cambio por referencia a los argumentos de Hopp/Woods y Kyte-Doolite, bien conocidos en la técnica.

La presente solicitud describe además unos fragmentos polipeptídicos modificados química o enzimáticamente para mejorar su estabilidad, su biodisponibilidad y/o su actividad. Ventajosamente, se mejoran las actividades de activación y/o de reclutamiento de las células del sistema inmunitario. El experto en la materia conoce numerosas técnicas para modificar química o enzimáticamente unos aminoácidos (véase también David L. Nelson y Michael M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3ª edición, 2000).

De manera no limitativa, se puede, modificar por ejemplo uno o varios aminoácidos lisina (K) por:

amidación: esta modificación es simple de realizar, siendo la carga positiva de la lisina sustituida por unos grupos hidrófobos (por ejemplo, acetilo o fenilacetilo);

aminación: por formación de amidas secundarias a partir de la amina primaria  $R = (CH_2)_4-NH_3^+$ , por ejemplo formando unos grupos N-metilo, N-alilo o N-bencilo;

o también por formación de los grupos N-óxido, N-nitroso, N-dialquil fosforilo, N-sulfenilo, o N-glicósido.

Por otro lado, se puede también, o alternativamente, modificar uno o varios aminoácidos treonina (T) y/o serina (S) de los péptidos, en particular introduciendo, a nivel del grupo OH de la cadena lateral de la treonina y/o de la serina, un grupo éster o éter. La esterificación, operación simple, se puede realizar con la ayuda de un ácido carboxílico, de un anhídrido, por enlace cruzado, etc. para formar, por ejemplo, unos acetatos o unos benzoatos. La eterificación, que da unos compuestos más estables, se puede efectuar con la ayuda de un alcohol, de un halogenuro, etc. para formar por ejemplo un metiléter o un O-glicósido. Por otro lado, se puede también, o alternativamente, modificar uno o varios aminoácidos glutamina (Q) por ejemplo por aminación, formando unas aminas secundarias o terciarias, en particular con unos grupos de tipo metilo, etilo, funcionalizados o no. Se puede por otro lado también, o alternativamente, modificar uno o varios aminoácidos glutamato (E) y/o aspartato (D), por ejemplo:

por esterificación, para formar unos metilésteres sustituidos o no, unos etilésteres, unos bencilésteres, unos tioles (ésteres activados), etc.,

por amidación, en particular para formar unos grupos N, N dimetilo, nitroanilidos, pirrolidinilos, etc.

Por el contrario, es preferible no modificar los aminoácidos prolina, que participan en la estructura secundaria de los péptidos, sabiendo además que los aminoácidos G, A y M no ofrecen generalmente ninguna posibilidad de modificación que sería manifiestamente interesante.

Los fragmentos de IL-33 identificados por los presentes inventores (IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub>, y/o sus homólogos), que corresponden a las formas naturales generadas por las proteasas de neutrófilos humanos, se pueden obtener por ingeniería genética, utilizando un sistema de producción de proteína recombinante procariota o eucariota, en particular i) cultivando un microorganismo o unas células eucariotas transformadas con la ayuda de una secuencia nucleotídica que codifica estos diferentes fragmentos de IL-33 y ii) aislando los fragmentos de IL-33 producidos por dicho microorganismo o dichas células eucariotas. Esta técnica es bien conocida por el experto en la materia. Para más detalles sobre ella, se podrá hacer referencia a la obra siguiente: *Recombinant DNA Technology I*, editores Ales Prokop, Raskesh K Bajpai; *Annals of the New-York Academy of Sciences*, volumen 646, 1991. Los fragmentos peptídicos de IL-33 de la invención son preferentemente purificados/aislados a partir del lisado de células y/o de sobrenadantes de células por las cuales se expresan y/o segregan. Esta purificación puede llevarse a cabo mediante cualquier medio conocido por el experto en la materia. En Voet D y Voet JG, "Techniques de purification des protéines y des acides nucléiques", capítulo 6, *Biochimie*, 2ª edición, se describen numerosas técnicas de purificación.

Los sistemas de producción de proteína recombinante utilizan unos vectores nucleotídicos que comprenden unos ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos a sintetizar, que son introducidos en unas células hospedantes que producen dichos polipéptidos (para más detalles, referirse a "Recombinant DNA Technology I", editores Ales Prokop, Raskesh K Bajpai; *Annals of the New-York Academy of Sciences*, volumen 646, 1991).

En un segundo aspecto, la invención tiene como objetivo por lo tanto un ácido nucleico aislado que codifica por lo menos uno de los fragmentos polipeptídicos según la invención, es decir que codifica por lo menos un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por las SEC ID nº 2, SEC ID nº 3 o SEC ID nº 4. La presente solicitud describe además los ácidos nucleicos aislados que codifican los homólogos de dichos fragmentos polipeptídicos. El término "homólogos" designa aquí también un polipéptido que tiene una secuencia

idéntica en por lo menos un 80%, preferentemente en un 85%, preferentemente en un 87%, preferentemente en un 90%, preferentemente en un 92%, preferentemente en un 95%, preferentemente en un 97%, preferentemente en un 98% y de manera aún más preferida en un 99% a una de las secuencias SEC ID nº 2, SEC ID nº 3 o SEC ID nº 4.

- 5 En un modo de realización preferido, un ácido nucleico según la invención tiene entre 486 y 528 pares de bases. Más preferentemente, un ácido nucleico de la invención comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 9, SEC ID nº 10 o SEC ID nº 11.

- 10 En un tercer aspecto, la invención tiene también como objetivo un vector que comprende por lo menos un ácido nucleico según la invención. Este vector puede servir para la producción de los fragmentos polipeptídicos de la invención (vectores de clonación y/o de expresión que contienen el ácido nucleico según la invención) o también para transportar dicho fragmento *in vivo* con fines de terapia génica.

- 15 Se conocen numerosos vectores en los que se pueden insertar una molécula de ácido nucleico de interés con el fin de introducirla y mantenerla en una célula hospedante eucariota o procariota; la elección de un vector apropiado depende de la utilización considerada para este vector (por ejemplo replicación de la secuencia de interés, expresión de esta secuencia, mantenimiento de esta secuencia en forma extracromosómica o bien integración en el material cromosómico del hospedante), así como de la naturaleza de la célula hospedante (por ejemplo, los plásmidos se introducen preferentemente en unas células bacterianas, mientras que los YACs se utilizan preferentemente en unas levaduras). Estos vectores de expresión pueden ser unos plásmidos, unos YACs, unos cósmidos, unos retrovirus, unos episomas derivados de EBV, y todos los vectores que el experto en la materia puede juzgar apropiados para la expresión de dichas cadenas. En un modo de realización preferido de la invención, el vector utilizado para codificar el fragmento polipeptídico de la invención es el vector pcDNA3.1 (+) de SEC ID nº 14 (Invitrogen) para los estudios *in vitro* y los vectores pET (Novagen) para las producciones a gran escala en la bacteria.

- 25 Los vectores según la invención comprenden el ácido nucleico que codifica por lo menos uno de los fragmentos polipeptídicos de la invención, o una secuencia similar, así como los medios necesarios para su expresión. Se entiende por "medio necesario para la expresión de un péptido", siendo el término péptido utilizado para cualquier molécula peptídica, tal como proteína, poliproteína, polipéptido, etc., cualquier medio que permite obtener el péptido, tal como en particular un promotor, un terminador de transcripción, un origen de replicación y preferentemente un marcador de selección. Los medios necesarios para la expresión de un péptido están enlazados de manera operacional a la secuencia de ácido nucleico que codifica para el fragmento polipeptídico de la invención. Por "enlazados de manera operacional", se entiende una yuxtaposición de dichos elementos necesarios para la expresión y del gen que codifica para el fragmento polipeptídico de la invención, los cuales están en una relación tal que esto les permite funcionar de manera esperada. Por ejemplo, pueden existir unas bases suplementarias entre el promotor y el gen que codifica el fragmento polipeptídico de la invención mientras que su relación funcional esté preservada. Los medios necesarios para la expresión de un péptido pueden ser unos medios homólogos, es decir naturalmente comprendidos en el genoma del vector utilizado, o bien ser heterólogos, es decir añadidos de manera artificial a partir de otro vector y/u organismo. En este último caso, dichos medios son clonados con el fragmento polipeptídico a expresar. Unos ejemplos de promotores heterólogos comprenden (i) los promotores virales tales como el promotor SV40 (Virus del simio 40), el promotor del gen de la timidina-quinasa del virus simplex del herpes (TK-HSV-1), el LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) y el promotor tardío mayor adenovirico (MLP), así como (ii) cualquier promotor celular que controla la transcripción de los genes que codifican para unos péptidos en unos eucariotas superiores, tal como el promotor del gen de fosfoglicerato-quinasa (PGK) constitutivo (Adra *et al.*, Gene 1987), el promotor de los genes específicos del hígado alfa-antitripsina y FIX y el promotor SM22 específicos de las células del músculo liso (Moessler *et al.*, Development 1996). Los métodos de supresión y de inserción de secuencias de ADN en unos vectores de expresión son ampliamente conocidos por el experto en la materia y consisten en particular en etapas de digestión enzimática y ligadura. Los vectores de la invención pueden también comprender unas secuencias necesarias para la focalización de los péptidos hacia unos compartimientos celulares particulares. Un ejemplo de focalización puede ser la focalización hacia el retículo endoplásmico obtenido utilizando unas secuencias de direccionamiento del tipo de la secuencia líder procedente de la proteína E3 del adenovirus (Ciernik I. F., *et al.*, The Journal of Immunology, 1999).

- 55 La expresión "terminador de transcripción" designa aquí una secuencia del genoma que marca el final de la transcripción de un gen o de un operón, en ARN mensajero. El mecanismo de terminación de la transcripción es diferente en los procariotas y en los eucariotas. El experto en la materia conoce las señales a utilizar en función de los diferentes tipos celulares. Por ejemplo, si la célula en la que el vector va a ser introducido es una bacteria, se utilizará un terminador Rho-independiente (secuencia repetida inversa seguida de una serie de T (uracilos sobre el ARN transcrito) o un terminador Rho-dependiente (constituido por una secuencia de consenso reconocida por la proteína Rho).

- 60 La expresión "origen de replicación" (también denominada ori) es una secuencia única de ADN que permite el inicio de la replicación. Es a partir de esta secuencia cuando que empieza una replicación unidireccional o bidireccional. El experto en la materia sabe que la estructura del origen de replicación varía de una especie a otra; por lo tanto, es específica, a pesar de que tengan todas ciertas características. Un complejo proteico se forma a nivel de esta secuencia y permite la apertura del ADN y el inicio de la replicación.

Los marcadores de selección son bien conocidos por el experto en la materia. De manera preferida, se trata de un gen que codifica una proteína que confiere una resistencia a un antibiótico.

Los vectores de la invención, que comprenden el o los ácidos nucleicos de interés de la invención, se preparan mediante los métodos habitualmente utilizados por el experto en la materia. Los clones resultantes pueden ser introducidos en un hospedante apropiado por unos métodos estándares conocidos por el experto en la materia para introducir unos polinucleótidos en una célula hospedante. Tales métodos pueden ser la transformación con la ayuda de dextrano, la precipitación por fosfato de calcio, la transfección con la ayuda de polibreno, la fusión de protoplastos, la electroporación, la encapsulación de los polinucleótidos en liposomas, la inyección biolística y la microinyección directa de ADN en el núcleo. Se puede asociar también dicha secuencia (aislada o insertada en un vector plasmídico) con una sustancia que le permita franquear la membrana de las células hospedantes, tal como un transportador como un nanotransportador o una preparación de liposomas, o de polímeros catiónicos. Además, ventajosamente se puede combinar estos métodos, por ejemplo utilizando la electroporación asociada a unos liposomas.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un microorganismo o a una célula hospedante eucariota transformada de manera transitoria o estable por - o que comprende - uno por lo menos de los ácidos nucleicos de la invención o por uno de los vectores de la invención.

A título de ejemplos de microorganismo que son convenientes para los fines de la invención, se pueden citar las levaduras (Buckholz RG, Current Opinion in Biotechnology 1993) y las bacterias (Olins y Lee, Current Opinion in Biotechnology 1993). A título de ejemplos de células eucariotas, se pueden citar las células que provienen de animales tales como los mamíferos (Edwards CP y Aruffo A, Current Opinion in Biotechnology 1993), los reptiles, y equivalente. Se pueden utilizar asimismo las células de plantas. Entre las células de mamífero, se pueden utilizar en particular las células de ovario de hámster chino (CHO), del simio (células COS y Vero), del riñón del hámster enano (células BHK), del riñón de cerdo (células PK 15) y del riñón de conejo (células RK13, las líneas celulares humanas de osteosarcoma (células 143 B), las líneas celulares humanas HeLa y las líneas celulares humanas de hepatoma (del tipo células Hep G2). Es asimismo posible utilizar unas células de insectos en las que se pueden utilizar unos procedimientos que utilizan unos baculovirus por ejemplo (Luckow VA, Journal of Virology 1993). En un modo de realización preferido de la invención, la célula hospedante utilizada para producir el fragmento de la invención es una bacteria, preferentemente la bacteria BL21.

El experto en la materia conoce las condiciones en las que cultivar estas células, así como las condiciones experimentales necesarias para la expresión de los fragmentos polipeptídicos por estas células.

Bajo otro aspecto, la invención tiene también por objeto un procedimiento de producción de un fragmento polipeptídico recombinante según la invención, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

- a) el cultivo en un medio y condiciones de cultivo apropiados de una célula hospedante según la invención; y
- b) el aislamiento del fragmento polipeptídico según la invención producido en la etapa a).

El fragmento puede ser aislado (purificado) a partir de la célula que expresa dicho fragmento. En este caso, podrá ser necesaria una etapa previa de lisis de dichas células.

Los medios y condiciones de cultivo asociados a cada tipo celular utilizado para la producción de proteínas recombinantes son bien conocidos por el experto en la materia.

El aislamiento (o la purificación) del fragmento polipeptídico de la invención puede realizarse mediante cualquier medio conocido por el experto en la materia. Se citará, por ejemplo, la precipitación diferencial o la ultracentrifugación. Puede también ser ventajoso purificar los fragmentos de interés por cromatografía de intercambio iónico, por cromatografía de afinidad, por tamizado molecular, o por isofocalización. Todas estas técnicas se describen en Voet D y Voet JG, "Techniques de purification des protéines y des acides nucléiques", capítulo 6, Biochimie, 2 edición.

Más precisamente, en una primera etapa, el material del cual se desea extraer la proteína (tejido animal, parte de plantas, bacterias, etc.) está generalmente triturado. Para ello se pueden emplear diversos aparatos ("Waring Blender", aparato Potter-Eveljhem, "Polytron", etc.). Esta homogeneización se realiza en un tampón de composición apropiada, bien conocida por el experto en la materia. El homogeneizado así obtenido se clarifica después, generalmente por centrifugación, para eliminar las grandes partículas poco o mal trituradas o también para obtener la fracción celular que contiene la proteína buscada. Si la proteína está justamente en un compartimiento celular, se utiliza generalmente un detergente suave (Tritón, Tween, etc., a veces desoxicolato) para liberarla disolviendo las membranas de este compartimiento. El empleo de detergente debe ser realizado frecuentemente de manera controlada, ya que pueden romper los lisosomas, lo que libera unas enzimas hidrolíticas (proteasas, nucleasas, etc.) que pueden atacar y destruir las proteínas u otras moléculas que se desea aislar. Se deben tomar unas precauciones particulares si se trabaja con unas proteínas sensibles a la degradación o poco numerosas. Una

solución frecuente a este problema es la inclusión en las soluciones de inhibidores de proteasas que son o bien fisiológicos (inhibidor de tripsina, antipaína, leupeptina, etc.) o artificiales (E64, PMSF, etc.). Después, existen diversas técnicas para aislar la proteína buscada. Uno de los métodos que se presta mejor a grandes volúmenes es la precipitación diferencial con sulfato de amonio. Las cromatografías de intercambio iónico o las cromatografías de afinidad, aplicables a buenos volúmenes de muestra, pero que tiene un poder de separación bastante bueno, constituyen buenos métodos intermedios. Para finalizar la purificación, se utilizan frecuentemente el tamizado molecular o la isofocalización. Esta técnica permite refinar la pureza, pero necesitan volúmenes muy pequeños de proteínas concentradas. Es frecuentemente ventajoso, entre estas etapas, eliminar las sales o productos utilizados en estas cromatografías. Esto se puede obtener por diálisis o por ultrafiltración.

Puede ser ventajoso utilizar un vector según la invención que lleva una secuencia que permite identificar los fragmentos polipeptídicos de la invención. Además, puede ser ventajoso facilitar la secreción en un sistema procariota o eucariota. En efecto, en este caso, los fragmentos recombinantes de interés estarán presentes en el sobrenadante del cultivo celular en lugar del interior de las células hospedantes.

Así, utilizando una u otra de estas técnicas, y contrariamente a la forma entera de IL-33 humana, los fragmentos polipeptídicos de IL-33 identificados por los presentes inventores (IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub>) pueden ser producidos por las células recombinantes de la invención en grandes cantidades (véase el ejemplo c) siguiente). Más precisamente, los fragmentos de la invención pueden ser producidos a niveles que alcanzan por lo menos 1mg por litro, preferentemente 2 mg por litro, de manera aún más preferida, 5mg por litro de cultivo celular.

De manera alternativa, es posible preparar los fragmentos polipeptídicos según la invención por síntesis química. Tal procedimiento de preparación es también un objeto de la invención. El experto en la materia conoce los procedimientos de síntesis química, por ejemplo las técnicas que utilizan unas fases sólidas o unas técnicas que utilizan unas fases sólidas parciales, por condensación de fragmentos o por una síntesis en solución clásica. Los fragmentos de la invención pueden, por ejemplo, ser sintetizados mediante las técnicas de química de síntesis, tales como la síntesis de tipo Merrifield que es ventajosa por razones de pureza, de especificidad antigénica, de ausencia de productos secundarios no deseados y para su facilidad de producción. Esta síntesis química puede ser acoplada a un enfoque de ingeniería genética o por ingeniería genética sólo utilizando las técnicas bien conocidas por el experto en la materia y descritos por ejemplo en Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989. Los reactivos y productos de partida están comercialmente disponibles, o pueden ser sintetizados por unas técnicas convencionales bien conocidas (véanse, por ejemplo, los documentos WO 00/12508, WO 2005/085260).

Los nuevos fragmentos de IL-33 identificados por los presentes inventores presentan *in vitro* e *in vivo* una actividad biológica superior a la forma entera de IL-33 humana y/o a la forma truncada IL-33<sub>aa112-270</sub> utilizada hasta ahora.

Estos fragmentos pueden ser utilizados ventajosamente como agonistas *in vitro* de los receptores ST2 o de cualquier otro receptor que se une a la IL-33 humana. En otro aspecto, la invención tiene también como objetivo los fragmentos de la invención para su utilización como agonistas *in vivo* de los receptores ST2 o de cualquier otro receptor que se une a la IL-33 humana. Mediante "receptor ST2", se entiende preferentemente la proteína de la secuencia SEC ID nº 12 (isoforma 1, NP\_057316.3) o SEC ID nº 13 (isoforma 2, NP\_003847.2), denominada de otra manera "T1", "DER4", "IL1R1", "FIT-1", "MGC32623" o también "IL33R".

Los fragmentos de la invención son capaces de estimular eficazmente la secreción de IL-6 por unas células mastocitarias *in vitro*, y de reclutar *in vivo* las células del sistema inmunitario (aumento del peso del bazo y del número de granulocitos en la sangre de los ratones). Pueden por lo tanto tener *in vivo* una actividad terapéutica significativa, en particular contra las enfermedades que reaccionan positivamente a la administración de IL-33 humana nativa.

En otro aspecto, la presente invención tiene por lo tanto como objetivo una composición farmacéutica que comprende uno por lo menos de los fragmentos polipeptídicos aislados de la invención, o uno por lo menos de los ácidos nucleicos que codifican los fragmentos polipeptídicos de la invención. En el caso en el que la composición comprende el fragmento polipeptídico de la invención, dicho fragmento se puede obtener por vía recombinante, o también por vía de síntesis química.

Preferentemente, dicha composición se adicionará de un excipiente y/o de un vehículo farmacéuticamente aceptable. En la presente descripción, se entiende designar por vehículo farmacéuticamente aceptable, un compuesto o una combinación de compuestos que entran en una composición farmacéutica que no provoca reacciones secundarias, y que permite, por ejemplo, la facilitación de la administración del o de los compuestos activos, el aumento de su tiempo de vida y/o de su eficacia en el organismo, el aumento de su solubilidad en solución o también la mejora de su conservación. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y se adaptarán por el experto en la técnica en función de la naturaleza y del modo de administración del o de los compuestos activos seleccionados.

Preferentemente, estos compuestos se administrarán por vía sistémica, en particular por vía intravenosa, por vía intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea, por vía oral, o por vía tópica (mediante gel, aerosoles,

gotas, etc.). De manera más preferida, la composición farmacéutica de la invención se administrará en varias tomas, de manera espaciada en el tiempo. Su modo de administración, su posología y su forma galénica óptima pueden ser determinados según los criterios generalmente tomados en cuenta en la preparación de un tratamiento adecuado para un paciente, como por ejemplo la edad o el peso corporal del paciente, la gravedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios constatados.

En otro aspecto, la invención se refiere también a los fragmentos polipeptídicos de la invención, para su utilización como medicamento.

Más precisamente, la invención tiene como objetivo cada uno de los fragmentos polipeptídicos de la invención, para su utilización como medicamento que permite tratar las enfermedades que reaccionan positivamente a la administración de IL-33 humana nativa, como por ejemplo las enfermedades infecciosas como la sepsis, las queratitis debidas a *Pseudomonas*, la tuberculosis o las infecciones debidas a un nematodo o al virus de la influenza, la aterosclerosis, las enfermedades cardiovasculares tales como el infarto del miocardio, el cáncer o también la inflamación de los tejidos adiposos en caso de obesidad. En otras palabras, la invención se refiere a la utilización de por lo menos uno de los fragmentos polipeptídicos de la invención, para la fabricación de un medicamento destinado a tratar las enfermedades infecciosas como la sepsis, las queratitis debido a *Pseudomonas*, la tuberculosis o las infecciones debido a un nematodo o al virus de la influenza, la aterosclerosis, las enfermedades cardiovasculares tales como el infarto del miocardio, el cáncer o también la inflamación de los tejidos adiposos en caso de obesidad.

Las enfermedades cardiovasculares consideradas por la presente invención son, por ejemplo las enfermedades de las coronarias, las enfermedades del músculo cardíaco, las enfermedades de las válvulas cardíacas, la enfermedad del pericardio, las enfermedades del ritmo o de la conducción cardíaca, las enfermedades de los vasos u otras. Las enfermedades de las coronarias consideradas son, por ejemplo, la angina de pecho o el infarto del miocardio. Las enfermedades del músculo cardíaco consideradas por la invención son, por ejemplo la cardiomiopatía o la insuficiencia cardíaca. Las enfermedades de las válvulas cardíacas consideradas son, por ejemplo la endocarditis o las valvulopatías cardíacas. Por "enfermedad del pericardio", se entiende comúnmente la pericarditis. Las enfermedades del ritmo o de la conducción cardíaca son, por ejemplo el síncope de origen cardiovascular, los trastornos de la conducción cardíaca, o los trastornos del ritmo cardíaco. Las enfermedades de los vasos consideradas son, por ejemplo el aneurisma, la arteriopatía ocluyente de los miembros inferiores, la disección aórtica aguda, la hipertensión arterial pulmonar, o la enfermedad trombo-embólica. Las otras enfermedades consideradas por la invención son, por ejemplo, la parada cardio-circulatoria, la cardiopatía congénita, la hipertensión arterial, la hipotensión arterial, o el síndrome de Adams-Stokes.

Entre los cánceres que pueden ser prevenidos y/o tratados por el o los fragmentos polipeptídicos de la invención, se consideran particularmente el cáncer de la próstata, los osteosarcomas, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de endometrio, el cáncer de colon, el mieloma múltiple o el cáncer de los ovarios, el cáncer de páncreas, el melanoma o cualquier otro cáncer.

La presente invención tiene también como objetivo un método de tratamiento que comprende la administración a un paciente de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de uno de los fragmentos polipeptídicos de la invención o uno de los ácidos nucleicos de la invención que codifica para éste. Preferentemente, este método de tratamiento permite prevenir y/o tratar las enfermedades infecciosas como la sepsis, la queratitis debido a *Pseudomonas*, la tuberculosis o las infecciones debido a un nematodo o al virus de la influenza, la aterosclerosis, las enfermedades cardio-vasculares, el cáncer, o también la inflamación de los tejidos adiposos en caso de obesidad, en los pacientes que los padecen.

La presente invención tiene por lo tanto como objetivo en particular una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico de la invención o el vector nucleotídico de la invención. Esta composición farmacéutica puede por lo tanto ser utilizada con fines de terapia génica.

Para ello, la presente invención tiene como objetivo las células de mamíferos, incluyendo las células humanas, preferentemente no embrionarias, que comprenden uno de los vectores o uno de los ácidos nucleicos de la invención. En el ámbito de la presente invención, el principio de la terapia génica es administrar a un paciente un ácido nucleico que codifica el o los fragmentos polipeptídicos de interés de la invención, en condiciones tales que son expresados *in vivo* por las células del paciente en las que el ácido nucleico se ha transferido.

Tal ácido nucleico puede estar en particular en forma de un vector de ADN, por ejemplo un vector plasmídico. Se pueden administrar uno o varios vectores, pudiendo cada vector llevar una o varias secuencia(s) que codifican para por lo menos uno de los fragmentos polipeptídicos de interés. El o los vectores de ADN pueden ser introducidos *in vivo* mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia. En particular, es posible introducir el vector de ADN *in vivo* en una forma natural, es decir sin la ayuda de cualquier vehículo o sistema que facilitaría la transfección del vector en las células (EP 0 465 529). Se puede utilizar también un "cañón de genes", por ejemplo depositando el ADN en la superficie de partículas "de oro" y proyectando éstas de manera que el ADN penetre a través de la piel de un paciente. También son posibles unas inyecciones mediante un gel líquido para transfectar al mismo tiempo la piel,

el músculo, el tejido graso y el tejido mamario (Furth *et al.*, Anal Biochem 1992). Técnicas de microinyección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, formulaciones con la ayuda de nanocápsulas o de liposomas son otras técnicas disponibles. Son particularmente ventajosas unas nanopartículas de polialquilcianoacrilato biodegradables. En el caso de liposomas, la utilización de lípidos catiónicos favorece la encapsulación de ácidos nucleicos que son cargados negativamente, y facilita la fusión con las membranas celulares cargadas negativamente. De manera alternativa, el vector puede estar en forma de un virus recombinante que comprende, insertada en su genoma, una secuencia de ácido nucleico que codifica para dicho o dichos péptido(s). El vector viral se puede seleccionar preferentemente de entre un adenovirus, un retrovirus, en particular un lentivirus, así como un virus adeno-asociado (AAV), un virus del herpes, un citomegalovirus (CMV), un virus de la viruela, etc. De manera ventajosa, el virus recombinante es un virus defectivo.

El término "virus defectivo" designa un virus incapaz de replicarse en una célula diana. Generalmente, el genoma de los virus defectivos está desprovisto de por lo menos las secuencias necesarias para la replicación de dicho virus en la célula infectada. Estas regiones pueden ser o bien eliminadas, o bien convertidas en no funcionales o también sustituidas por otras secuencias y en particular por el ácido nucleico que codifica para el fragmento polipeptídico de interés. Sin embargo, preferentemente, el virus defectivo conserva a pesar de todo las secuencias de su genoma necesarias para la encapsulación de las partículas virales. En la solicitud WO 95/28 494, por ejemplo, se describe una administración direccionada de genes.

En otro aspecto, la presente invención tiene como objetivo la utilización de un fragmento polipeptídico según la invención, eventualmente obtenido mediante uno de los procedimientos de la invención, o el ácido nucleico de la invención, en combinación con otro medicamento, por ejemplo en combinación con un agente quimioterapéutico para el tratamiento del cáncer, asociado a una prótesis vascular (o stent) para el tratamiento por angioplastia de las enfermedades cardiovasculares, o como adyuvante de una vacuna contra un virus, como el virus de la influenza.

En un modo de realización preferido, el fragmento polipeptídico de la invención está combinado con un agente quimioterapéutico comprendido del grupo constituido por: los agentes alquilantes, los antimetabolitos, los alcaloides vegetales, los inhibidores de la topoisomerasa, los antibióticos antitumorales, o los venenos del huso mitótico. Por "agentes alquilantes" se consideran, entre otros, el busulfán, el carboplatino, el clorambucil, el cisplatino, la ciclofosfamida, la isofamia, la melfalán, la mecloretamina, el oxaliplatino, la uramustina, o también la temozolomida. Por "antimetabolitos" se consideran, entre otros, la azatioprina, la capecitabina, la citarabina, la floxuridina, la fludarabina, el fluorouracilo, la gemcitabina, el metotrexato, o también el pemetrexed. Los "alcaloides vegetales" son, por ejemplo la vinblastina, y la vincristina. Los "inhibidores de la topoisomerasa" son, por ejemplo el irinotecano, el topotecán, o también el etopósido. Los "antibióticos antitumorales" son, por ejemplo la bleomicina, la daunorrubicina, la doxorubicina, la epirubicina, la hidroxiurea, la idarrubicina, la mitomicina C, o también la mitoxantrona. Finalmente, los "venenos del huso mitótico" son, por ejemplo el docetaxel, el paclitaxel, la vinblastina, la vincristina, o también la vinorelbina.

Según otro aspecto, la presente invención tiene como objetivo la utilización de un fragmento polipeptídico aislado según la invención, eventualmente obtenido mediante uno de los procedimientos de la invención, o el ácido nucleico de la invención, para diagnosticar una infección o un traumatismo en un individuo.

El diagnóstico se puede establecer utilizando una técnica de ELISA que permite detectar específicamente los nuevos fragmentos de IL-33 (IL-33<sub>aa95-270</sub> IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub>) en el suero o el plasma de los pacientes.

En efecto, un aumento de la cantidad de IL-33 en la sangre o el suero podría demostrar una infección, una inflamación o un traumatismo en un individuo. Por lo tanto, se puede considerar la utilización de los fragmentos polipeptídicos de la invención, que son susceptibles de ser formados *in vivo* por la acción de las proteasas endógenas, como marcador de un estado infeccioso o inflamatorio.

Ventajosamente, estos fragmentos particulares de IL-33 pueden ser detectados mediante anticuerpos que los reconocen específicamente.

En un último aspecto, la presente invención tiene como objetivo por lo tanto un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente uno de los fragmentos polipeptídicos de la presente invención, pero que no reconoce la forma entera IL-33<sub>aa1-270</sub> ni la forma truncada IL-33<sub>aa112-270</sub>. De manera ventajosa, dicho anticuerpo es un anticuerpo conformacional, es decir un anticuerpo que reconoce un epítipo conformacional.

Un anticuerpo según la invención se puede preparar mediante las técnicas clásicas conocidas por el experto en la materia, tales como las descritas en "Antibodies: A Laboratory Manual", E. Howell y D Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

De manera más precisa, tal anticuerpo puede ser producido a partir de hibridomas obtenidos por fusión de linfocitos B de un animal inmunizado por uno o varios fragmentos polipeptídicos de la invención, con unos mielomas, según la técnica de Köhler y Milstein (Nature, 1975); los hibridomas son cultivados *in vitro*, en particular en unos fermentadores, o producidos *in vivo*, en forma de ascita; alternativamente, dicho anticuerpo monoclonal puede ser

producido por ingeniería genética como se describe en la patente americana US nº 4.816.567.

Los anticuerpos según la invención que reconocen específicamente los fragmentos polipeptídicos de la invención con una afinidad elevada (constante de afinidad del orden del nM), representan unos reactivos de diagnóstico fiables y sensibles para la detección, a partir de una muestra biológica apropiada (sangre total, células mononucleadas de la sangre periférica, biopsia tumoral), de los pacientes que sufren infecciones latentes o traumatismo.

En un modo de realización particular, la presente invención tiene por lo tanto también como objetivo un método de diagnóstico de infecciones o de traumatismos que utiliza los anticuerpos de la invención. Este método de diagnóstico puede utilizar estos anticuerpos en técnicas de citometría de flujo, de inmunocitoquímica o de inmunohistoquímica o bien de inmunoprecipitación a partir de células no fijadas (congeladas o vivas) o fijadas en condiciones no desnaturizantes que son conocidas por el experto en la materia.

La invención se describirá más precisamente mediante los ejemplos siguientes.

## Ejemplos

### a) Puesta en evidencia de los fragmentos de IL-33 de la invención

Las proteínas IL-33 humanas enteras (IL-33<sub>1-270</sub>, SEC ID nº 1) o truncadas (IL-33<sub>112-270</sub>, SEC ID nº 5) se han producido *in vitro* según las técnicas clásicas de producción de proteínas en unos lisados de reticulocitos según las recomendaciones del fabricante (Promega TnT Coupled Reticulocyte Lysate Systems ref L4610): se mezcla 1 µg de plásmido que permite la expresión de IL-33 de tamaño entero o truncada (pcDNA3-IL33 1-270 o 95-270 o 99-270 o 109-270) al lisado del reticulocito de conejo (25 µl) que contiene el tampón de reacción 10X (2 µl), la polimerasa T7 (1 µl), la mezcla de aminoácidos 1mM (1 µl), el inhibidor de RNasa RNasin (40U/µl) en un volumen de reacción de 50 µl final. Un control se efectúa utilizando el vector vacío pcDNA3. Se realiza una incubación a 30°C durante 90min. Para la escisión por las proteasas de los neutrófilos, se incuban después 5 µl de lisado programado o no a 37°C durante 1h con 1mU de Catepsina G (Calbiochem, ref.: 219373), o 30 min. con 0,3U de elastasa (Calbiochem ref.: 324681) o 30 min. con 0,25 µg de PR3 (Calbiochem ref.: 539483). Los productos de escisión son analizados por gel SDS-PAGE y transferencia Western con la ayuda de un anticuerpo monoclonal dirigido contra la parte C-terminal de IL-33 (IL-33305B, Alexis Biochemical ref.: ALX-804-726) (figura 2A). La IL-33 humana es la diana de las proteasas recombinantes Catepsina G (Cat G), Elastasa 2 (Elastasa), y Proteinasa 3 (PR3), que generan *in vitro* los tres fragmentos maduros IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub>. Por el contrario, las tres proteasas de neutrófilos no escinden el dominio de tipo citoquina IL-1 (dominio C-terminal), como lo muestran las dos transferencias de abajo en la figura 2A.

Además, se han aislado y purificados unos neutrófilos humanos a partir de sangre fresca total humana recogida sobre tubo EDTA, utilizando el medio de separación Polimorphprep (Axis-Shield; ref. 1114683). Los neutrófilos son resuspendidos en RPMI/Hepes (25mM) y repartidos en placas de 96 pocillos a razón de 100.000 neutrófilos/ml y 100 µl/pocillos, después activados con la ayuda de PMA (acetato de miristato 13 de Phorbol 12, 25 nM) durante 2 horas a 37°C. La proteína IL-33 entera (25 µl de lisado programado como se ha descrito anteriormente) se ha incubado con estos neutrófilos humanos, en presencia o en ausencia de inhibidor de proteasas de serina (AEBSF, 5 mM). El análisis de los fragmentos generados se ha realizado por transferencia Western con la ayuda de un anticuerpo anti-IL-33 dirigido contra la parte C-terminal (IL-33305B; Alexis Biochemical, ref.: ALX-804-726). Se ha realizado una comparación de los tamaños de los fragmentos generados con la ayuda de unas proteínas recombinantes IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub>. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 2B. Permiten demostrar que IL-33 humana es efectivamente la diana *ex vivo* de las proteasas de neutrófilos humanos Catepsina G (Cat G), Elastasa 2 (Elastasa), y Proteinasa 3 (PR3).

### b) Los nuevos fragmentos de IL-33 son 'superactivos' *in vitro*.

La actividad biológica de los nuevos fragmentos de IL-33, IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub>, se ha ensayado *in vitro* en dos ensayos funcionales, uno basado en la secreción de IL-5 dependiente de ST2 en una línea de basófilo humano, y el otro basado en la secreción de IL-6 dependiente de ST2 en una línea mastocitaria murina.

Brevemente, las células mastocitarias MC/9 (ATCC CRL-8306) se mantienen en un medio DMEM (ATCC, Ref.: 30-2002) que contiene 6 mM de glutamina, 0,05 mM de 2-mercaptoetanol, un 10% de Rat-T-STIM (Beckton-Dickinson, ref.: 354115) y un 10% de suero fetal de ternera (ATCC, ref.: 30-2020). Se reparten 200.000 células por pocillo en unas placas de 96 pocillos a razón de 200 µl/pocillo y después se incuban durante 24 horas a 37°C con las proteínas IL-33<sub>aa1-270</sub>, IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub> (10 µl de lisado de reticulocito programado). La cantidad de IL-6 segregada en el sobrenadante de cultivo se ha medido de manera clásica gracias a la técnica ELISA con la ayuda del kit 'mouse IL-6' (R&D ref.: DY406). Los resultados se han reducido al valor obtenido para IL-33 de tamaño completo IL-33<sub>aa1-270</sub>.

Las células de basófilos humanas KU812 (ATCC CRL-2099) se mantienen en un medio RPMI 1640 (ATCC, Ref.: 30-2001) suplementado de un 10% de suero fetal de ternera (ATCC, ref.: 30-2020). Se reparten 10<sup>6</sup> células por

pocillo en unas placas de 96 pocillos a razón de 200 µl/pocillo, después se incuban durante 24 horas a 37°C con las proteínas IL-33<sub>aa1-270</sub>, IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub> (8 µl de lisado de reticulocito programado). La cantidad de IL-5 segregada en el sobrenadante de cultivo se ha medido de manera clásica gracias a la técnica ELISA con la ayuda del kit 'human IL-5' (R&D, ref.: DY205).

En cada uno de estos ensayos, se ha puesto en evidencia que las proteínas recombinantes IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub>, presentaban una mayor actividad que la de la forma activa de tamaño completo IL-33<sub>aa1-270</sub> (Figura 3B y 3C). Los nuevos fragmentos de IL-33, IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub>, son por lo tanto 'superactivos' con respecto a la forma entera *in vitro*.

#### c) Procedimiento de producción/purificación de los fragmentos de IL-33 de la invención por vía recombinante.

Las proteínas recombinantes IL-33 humanas enteras o truncadas se han producido en la bacteria en fusión con una etiqueta 6xHistidina en N-terminal para permitir la purificación de las proteínas, según las técnicas clásicas utilizadas por el experto en la técnica. El Tag Histidina se ha eliminado después por una escisión con trombina y se ha purificado la proteína de interés por cromatografía de exclusión estérica.

Brevemente, se inocula un litro de medio de cultivo con la cepa transformada (BL21 pLysS-pET15b-IL-33<sub>aa1-270</sub> o BL21 pLysS-pET15b-IL-33<sub>aa95-270</sub>, o BL21 pLysS-pET15b-IL-33<sub>aa99-270</sub> o BL21 pLysS-pET15b-IL-33<sub>aa109-270</sub>). Cuando la DO alcanza 0,7, la expresión de la proteína de interés se induce por la adición de 1 mM de IPTG durante 4 horas a 37°C. Las bacterias son centrifugadas y el residuo se recoge en un tampón de lisis (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM, Tritón 0,5%, ADNaSA I 1 mM, lisosima 1 mM, inhibidor de proteasas). Después de la sonicación y de la ultracentrifugación, el lisado bacteriano se recupera y se incuba con unas perlas Nickel-NTA a 4° durante 4 horas. Las perlas se lavan y la proteína purificada por afinidad se eluye con 500 mM de imidazol. El eluato se libera después del imidazol y se dializa en tampón Tris-NaCl por centrifugación/concentración con la ayuda de Vivaspín (Sartorius; 20 ml de límite 10 kDa). El tag histidina se escinde por trombina (250 unidades/ml, 4°C, 20h) y la proteína se purifica después por cromatografía sobre gel permeable ('Gel Filtración' - columna Superdex 75) seguida de una concentración por Vivaspín (Sartorius). El análisis de las diferentes etapas de purificación se efectúa por gel SDS-PAGE y coloración en azul de Coomassie. Las proteínas purificadas son cuantificadas por determinación con Nanodrop (Thermoscientific), y se ha determinado la presencia de endotoxina utilizando el kit 'Limulus Amebocyte Lysate' (Cambrex, Ref.: 50-647U).

En la figura 4 se muestran unos ejemplos de producción/purificación de las proteínas IL-33 (formas entera o escindidas). Por lo menos 9 mg de proteínas que corresponden a los fragmentos de IL-33 (IL-33<sub>95-270</sub>, IL-33<sub>99-270</sub>, IL-33<sub>109-270</sub>) han podido ser producidos a partir de un litro de cultivo bacteriano, mientras que menos de 1 µg ha podido ser obtenido para la forma de tamaño entero. El rendimiento para la producción de los fragmentos de IL-33 es por lo tanto por lo menos 9000 veces superior al obtenido para la forma de tamaño entero 1-270.

#### d) Los nuevos fragmentos de IL-33 son biológicamente 'superactivos' *in vivo*

La actividad biológica de los nuevos fragmentos de IL-33 se ha ensayado *in vivo* en el ratón y comparado con la actividad de la forma artificial IL-33<sub>aa112-270</sub>. Se excluye la utilización de la proteína humana IL-33 entera en este experimento, ya que es imposible obtener la cantidad requerida de proteína para la inyección (>340µg, teniendo en cuenta el número de ratones a inyectar, y del número total de inyecciones a efectuar). Las proteínas recombinantes IL-33<sub>aa112-270</sub>, IL-33<sub>aa95-270</sub>, IL-33<sub>aa99-270</sub> e IL-33<sub>aa109-270</sub> producidas en *Escherichia coli* (vector pET15b, Novagen; bacteria BL21) y purificadas por cromatografía de afinidad se han inyectado por vía intra-peritoneal (4 µg en 200 µl PBS) en unos ratones Balb/C (12 ratones hembras de 8 a 10 semanas) durante 7 días, diariamente. El análisis de los ratones ha mostrado unos cambios patológicos claros, en particular con un aumento del volumen y del peso del bazo después de 7 días (figura 4A), y una hiperplasia de las células caliciformes del yeyuno (figura 4B). De manera interesante, dos de los nuevos fragmentos de IL-33 (IL-33<sub>aa95-270</sub> e IL-33<sub>aa99-270</sub>) inducen a un aumento del número de granulocitos (mayoritariamente unos neutrófilos) en la sangre de los ratones después de 7 días, aumento significativamente más elevado que el inducido por la forma truncada IL-33<sub>aa112-270</sub> (Figura 4C), lo que indica que los nuevos fragmentos de IL-33, IL-33<sub>aa95-270</sub> e IL-33<sub>aa99-270</sub>, son 'superactivos' *in vivo*. Este último resultado es muy inesperado, ya que no se había sospechado antes la existencia de fragmentos de IL-33 más activos que la forma IL-33<sub>aa112-270</sub>.

#### Referencias bibliográficas

- Adra *et al.*, 1987, Gene, 60: 65-74  
 Ali *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 2010, 391:1512-6  
 Alves-Filho *et al.*, Nature Medicine 2010, 16:708-12  
 Baekkevold E. *et al.*, American Journal Pathology 2003, 163:69-79  
 Bieth JG, J. Soc. Biol. 2001, 195(2): 173-9  
 Buckholz RG, Current Opinion in Biotechnology 1993, 4(5):538-42  
 Burster T. *et al.*; Molecular Immunology 2010, 47:658-665  
 Carrière V. *et al.*, PNAS 2007, 104:282-287

- Cayrol y Girard, PNAS 2009, 106(22):9021-6  
 Chackerian AA *et al.*, Journal of Immunology 2007, 179: 2551-5  
 Ciernik I. F., *et al.*, The Journal of Immunology, 1999, 162, 3915-3925  
 David L. Nelson y Michael M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, 3ª edición, 2000  
 5 Edwards CP y Aruffo A, Current Opinion in Biotechnology 1993, 4(5):558-63  
 Furth PA *et al.*, 1992 Anal Biochem. 1992 Sep; 205(2):365-8  
 Hausman RE *et al.* (2004). The cell: a molecular approach. Washington, D.C: ASM Press. p. 51  
 Hajjar E. *et al.*, FEBS Letters 2007, 581:5685-5690.  
 Hazlett *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci 2010, 51:1524-32  
 10 Humphreys *et al.*, Journal of Immunology 2008, 180:2443-9  
 Kargi *et al.*, 1990, J. Histochem. Cytochem.38(8):1179-86  
 Kôhler y Milstein, Nature, 1975,256, 495-497.  
 Korkmaz B. *et al.*, Pharmacological Reviews 2010, 62: 726-759.  
 Liew *et al.*, Nature Rev Immunology 2010, 10:103-110  
 15 Lingel *et al.*, Structure 2009, 17:1398-410  
 Luckow VA, Journal of Virology 1993, 67(8) 4566-79  
 Lüthi *et al.*, Immunity 2009; 31:84-98  
 Miller *et al.*, J. Exp. Med 2008, 205:339-46  
 Miller *et al.* Circ Res 2010 107:650-8  
 20 Moessler *et al.*, Development 1996, 122: 2415- 2425.  
 Moussion *et al.*, PLoS ONE 2008, 3(10):e3331  
 Nufer O *et al.*, Biochemistry 1999, 38(2):636-42  
 Olins y Lee, Current Opinion in Biotechnology 1993, 4(5):520-5  
 Pushparaj *et al.*, PNAS 2008, 106:9773-8  
 25 Rankin *et al.*, J Immunol 2010, 184:1526-35.  
 Rao NV *et al.*, PNAS 1991, 88; 9253-9256  
 Reen DJ, Methods Mol Biol. 1994, 32:461-6.  
 Sambrano G.R. *et al.*, J. Biol Chem. 2000, 275: 6819-6823.  
 Schmitz *et al.*, Immunity 2005, 23:479-90  
 30 Seki *et al.*, Circ Heart Fail 2009, 2:684-91  
 Sims JE y Smith DE, Nature Rev Immunology 2010, 10:89-102  
 Stolarski *et al.*, Journal of Immunology 2010, 185:3472-80  
 Talabot-Ayer *et al.*, J. Biol. Chem 2009; 284:19420-6  
 Tatusova *et al.*, FEMS Microbiol., 1999 Lett. 174:247-250  
 35 Xu *et al.*, Journal of Immunology 2010; 184:2620-6

#### Listado de secuencias

- <110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)  
 40 <120> NUEVOS FRAGMENTOS DE IL-33 SUPERACTIVOS Y SUS UTILIZACIONES  
 <130> 360405D29350  
 45 <150> FR 1151498  
 <151> 2011-02-24  
 <160> 16  
 50 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 270  
 <212> PRT  
 55 <213> homo sapiens  
 <400> 1

# ES 2 603 568 T3

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

5 <210> 2  
 <211> 176  
 <212> PRT

# ES 2 603 568 T3

<213> homo sapiens

<400> 2

Ala Phe Gly Ile Ser Gly Val Gln Lys Tyr Thr Arg Ala Leu His Asp  
1 5 10 15

Ser Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu  
20 25 30

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

Tyr Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys  
50 55 60

Val Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly  
65 70 75 80

Asp Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys  
85 90 95

Asp Phe Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His  
100 105 110

5 Lys Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn  
115 120 125

Met His Ser Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val  
130 135 140

Phe Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser  
145 150 155 160

Ser Glu Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr  
165 170 175

<210> 3

10 <211> 172

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 3

15

# ES 2 603 568 T3

```

Ser Gly Val Gln Lys Tyr Thr Arg Ala Leu His Asp Ser Ser Ile Thr
1          5          10          15

Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Thr Tyr Asn
          20          25          30

Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr Glu Ile Tyr
          35          40          45

Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys Val Leu Leu Ser
          50          55          60

Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly Asp Gly Val Asp
65          70          75          80

Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp Phe Trp Leu
          85          90          95

His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys Cys Glu Lys
          100          105          110

Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Met His Ser Asn
          115          120          125

Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe Ile Gly Val
          130          135          140

Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser Ser Glu Asn Leu
145          150          155          160

Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr
          165          170

```

<210> 4  
 <211> 162  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

<400> 4

# ES 2 603 568 T3

His Asp Ser Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala  
1 5 10 15

Ser Leu Ser Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp  
20 25 30

Glu Ser Tyr Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys  
35 40 45

Asp Lys Val Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu  
50 55 60

Ser Gly Asp Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro  
65 70 75 80

Thr Lys Asp Phe Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu  
85 90 95

Leu His Lys Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu  
100 105 110

His Asn Met His Ser Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro  
115 120 125

Gly Val Phe Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val  
130 135 140

Asp Ser Ser Glu Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser  
145 150 155 160

Glu Thr

<210> 5

<211> 159

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Forma truncada de IL-33 humana hS IL33 aminoácidos 112-270

<400> 5

# ES 2 603 568 T3

Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser  
1 5 10 15

Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr  
20 25 30

Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys Val  
35 40 45

Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly Asp  
50 55 60

Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp  
65 70 75 80

Phe Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys  
85 90 95

Cys Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Met  
100 105 110

His Ser Asn Cys Val Ser Phe Glu Cys Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe  
115 120 125

Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser Ser  
130 135 140

Glu Asn Leu Cys Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr  
145 150 155

<210> 6  
<211> 255  
<212> PRT  
<213> homo sapiens

<400> 6

Met Gln Pro Leu Leu Leu Leu Ala Phe Leu Leu Pro Thr Gly Ala  
1 5 10 15

Glu Ala Gly Glu Ile Ile Gly Gly Arg Glu Ser Arg Pro His Ser Arg  
20 25 30

Pro Tyr Met Ala Tyr Leu Gln Ile Gln Ser Pro Ala Gly Gln Ser Arg  
35 40 45

Cys Gly Gly Phe Leu Val Arg Glu Asp Phe Val Leu Thr Ala Ala His  
50 55 60

# ES 2 603 568 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cys | Trp | Gly | Ser | Asn | Ile | Asn | Val | Thr | Leu | Gly | Ala | His | Asn | Ile | Gln | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Arg | Arg | Glu | Asn | Thr | Gln | Gln | His | Ile | Thr | Ala | Arg | Arg | Ala | Ile | Arg | 85  | 90  | 95  |     |
| His | Pro | Gln | Tyr | Asn | Gln | Arg | Thr | Ile | Gln | Asn | Asp | Ile | Met | Leu | Leu | 100 | 105 | 110 |     |
| Gln | Leu | Ser | Arg | Arg | Val | Arg | Arg | Asn | Arg | Asn | Val | Asn | Pro | Val | Ala | 115 | 120 | 125 |     |
| Leu | Pro | Arg | Ala | Gln | Glu | Gly | Leu | Arg | Pro | Gly | Thr | Leu | Cys | Thr | Val | 130 | 135 | 140 |     |
| Ala | Gly | Trp | Gly | Arg | Val | Ser | Met | Arg | Arg | Gly | Thr | Asp | Thr | Leu | Arg | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Glu | Val | Gln | Leu | Arg | Val | Gln | Arg | Asp | Arg | Gln | Cys | Leu | Arg | Ile | Phe | 165 | 170 | 175 |     |
| Gly | Ser | Tyr | Asp | Pro | Arg | Arg | Gln | Ile | Cys | Val | Gly | Asp | Arg | Arg | Glu | 180 | 185 | 190 |     |
| Arg | Lys | Ala | Ala | Phe | Lys | Gly | Asp | Ser | Gly | Gly | Pro | Leu | Leu | Cys | Asn | 195 | 200 | 205 |     |
| Asn | Val | Ala | His | Gly | Ile | Val | Ser | Tyr | Gly | Lys | Ser | Ser | Gly | Val | Pro | 210 | 215 | 220 |     |
| Pro | Glu | Val | Phe | Thr | Arg | Val | Ser | Ser | Phe | Leu | Pro | Trp | Ile | Arg | Thr | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Thr | Met | Arg | Ser | Phe | Lys | Leu | Leu | Asp | Gln | Met | Glu | Thr | Pro | Leu |     | 245 | 250 | 255 |     |

<210> 7  
 <211> 256  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

<400> 7

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |   |    |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|----|----|
| Met | Ala | His | Arg | Pro | Pro | Ser | Pro | Ala | Leu | Ala | Ser | Val | Leu | Leu | Ala | 1 | 5 | 10 | 15 |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|----|----|

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|--|
| Leu | Leu | Leu | Ser | Gly | Ala | Ala | Arg | Ala | Ala | Glu | Ile | Val | Gly | Gly | His | 20 | 25 | 30 |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|--|

# ES 2 603 568 T3

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

<210> 8  
 <211> 267  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

<400> 8

# ES 2 603 568 T3

```

Met Thr Leu Gly Arg Arg Leu Ala Cys Leu Phe Leu Ala Cys Val Leu
1          5          10          15

Pro Ala Leu Leu Leu Gly Gly Thr Ala Leu Ala Ser Glu Ile Val Gly
          20          25          30

Gly Arg Arg Ala Arg Pro His Ala Trp Pro Phe Met Val Ser Leu Gln
          35          40          45

Leu Arg Gly Gly His Phe Cys Gly Ala Thr Leu Ile Ala Pro Asn Phe
50          55          60

Val Met Ser Ala Ala His Cys Val Ala Asn Val Asn Val Arg Ala Val
65          70          75          80

Arg Val Val Leu Gly Ala His Asn Leu Ser Arg Arg Glu Pro Thr Arg
          85          90          95

Gln Val Phe Ala Val Gln Arg Ile Phe Glu Asn Gly Tyr Asp Pro Val
          100          105          110

Asn Leu Leu Asn Asp Ile Val Ile Leu Gln Leu Asn Gly Ser Ala Thr
          115          120          125

Ile Asn Ala Asn Val Gln Val Ala Gln Leu Pro Ala Gln Gly Arg Arg
          130          135          140

Leu Gly Asn Gly Val Gln Cys Leu Ala Met Gly Trp Gly Leu Leu Gly
145          150          155          160

Arg Asn Arg Gly Ile Ala Ser Val Leu Gln Glu Leu Asn Val Thr Val
          165          170          175

Val Thr Ser Leu Cys Arg Arg Ser Asn Val Cys Thr Leu Val Arg Gly
          180          185          190

Arg Gln Ala Gly Val Cys Phe Gly Asp Ser Gly Ser Pro Leu Val Cys
          195          200          205

Asn Gly Leu Ile His Gly Ile Ala Ser Phe Val Arg Gly Gly Cys Ala
          210          215          220

Ser Gly Leu Tyr Pro Asp Ala Phe Ala Pro Val Ala Gln Phe Val Asn
225          230          235          240

Trp Ile Asp Ser Ile Ile Gln Arg Ser Glu Asp Asn Pro Cys Pro His
          245          250          255

Pro Arg Asp Pro Asp Pro Ala Ser Arg Thr His
          260          265

```

5 <210> 9  
 <211> 528  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

10 <400> 9

# ES 2 603 568 T3

|    |                                                                      |     |
|----|----------------------------------------------------------------------|-----|
|    | gccttttggtat taccaggggt ccagaaatat actagagcac ttcattgattc aagtatcaca | 60  |
|    | ggaatttcac ctattacaga gtatcttgct tctctaagca catacaatga tcaatccatt    | 120 |
|    | acttttgctt tggaggatga aagttatgag atatatgttg aagacttgaa aaaagatgaa    | 180 |
|    | aagaaagata aggtgttact gagttactat gaggctcaac acccctcaaa tgaatcaggt    | 240 |
|    | gacggtgttg atggttaagat gttaattgga accctgagtc ctacaaaaga cttctggttg   | 300 |
|    | catgcccaaca acaaggaaca ctctgtggag ctccataagt gtgaaaaacc actgccagac   | 360 |
|    | caggccttct ttgtccttca taatatgcac tccaactgtg tttcatttga atgcaagact    | 420 |
|    | gaccttgagg tgtttatagg tgtaaaggat aatcatcttg ctctgattaa agtagactct    | 480 |
|    | tctgagaatt tgtgtactga aaatatcttg tttaagctct ctgaaact                 | 528 |
|    | <210> 10                                                             |     |
|    | <211> 516                                                            |     |
| 5  | <212> ADN                                                            |     |
|    | <213> homo sapiens                                                   |     |
|    | <400> 10                                                             |     |
|    | tcaggggtcc agaaatatac tagagcactt catgattcaa gtatcacagg aatttcacct    | 60  |
|    | attacagagt atcttgcttc tctaagcaca tacaatgac aatccattac ttttgctttg     | 120 |
|    | gaggatgaaa gttatgagat atatgttgaa gacttgaaaa aagatgaaaa gaaagataag    | 180 |
|    | gtgttactga gttactatga gtctcaacac ccctcaaatg aatcagggtga cgggtgttgat  | 240 |
|    | ggtaagatgt taatggtaac cctgagtcct acaaaagact tctggttgca tgccaacaac    | 300 |
|    | aaggaacact ctgtggagct ccataagtgt gaaaaaccac tgccagacca ggccttcttt    | 360 |
|    | gtccttcata atatgcactc caactgtgtt tcatttgaat gcaagactga tcctggagtg    | 420 |
|    | tttatagggtg taaaggataa tcattctgct ctgattaaag tagactcttc tgagaatttg   | 480 |
| 10 | tgtactgaaa atatcttggt taagctctct gaaact                              | 516 |
|    | <210> 11                                                             |     |
|    | <211> 486                                                            |     |
|    | <212> ADN                                                            |     |
| 15 | <213> homo sapiens                                                   |     |
|    | <400> 11                                                             |     |
| 20 | catgattcaa gtatcacagg aatttcacct attacagagt atcttgcttc tctaagcaca    | 60  |
|    | tacaatgac aatccattac ttttgctttg gaggatgaaa gttatgagat atatgttgaa     | 120 |
|    | gacttgaaaa aagatgaaaa gaaagataag gtgttactga gttactatga gtctcaacac    | 180 |
|    | ccctcaaatg aatcagggtga cgggtgttgat ggtaagatgt taatggtaac cctgagtcct  | 240 |
|    | acaaaagact tctggttgca tgccaacaac aaggaacact ctgtggagct ccataagtgt    | 300 |
|    | gaaaaaccac tgccagacca ggccttcttt gtccttcata atatgcactc caactgtgtt    | 360 |
|    | tcatttgaat gcaagactga tcctggagtg tttatagggtg taaaggataa tcattctgct   | 420 |
|    | ctgattaaag tagactcttc tgagaatttg tgtactgaaa atatcttggt taagctctct    | 480 |
|    | gaaact                                                               | 486 |
|    | <210> 12                                                             |     |
|    | <211> 556                                                            |     |

# ES 2 603 568 T3

<212> PRT  
<213> homo sapiens

<400> 12

5

```

Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr
1           5           10           15

Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu
20           25           30

Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp
35           40           45

Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg
50           55           60

Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala
65           70           75           80

Asp Ser Gly Ile Tyr Thr Cys Ile Val Arg Ser Pro Thr Phe Asn Arg
85           90           95

Thr Gly Tyr Ala Asn Val Thr Ile Tyr Lys Lys Gln Ser Asp Cys Asn
100          105          110

Val Pro Asp Tyr Leu Met Tyr Ser Thr Val Ser Gly Ser Glu Lys Asn
115          120          125

Ser Lys Ile Tyr Cys Pro Thr Ile Asp Leu Tyr Asn Trp Thr Ala Pro
130          135          140

Leu Glu Trp Phe Lys Asn Cys Gln Ala Leu Gln Gly Ser Arg Tyr Arg
145          150          155          160

```

# ES 2 603 568 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | His | Lys | Ser | Phe | Leu | Val | Ile | Asp | Asn | Val | Met | Thr | Glu | Asp | Ala | 165 | 170 | 175 |     |
| Gly | Asp | Tyr | Thr | Cys | Lys | Phe | Ile | His | Asn | Glu | Asn | Gly | Ala | Asn | Tyr | 180 | 185 | 190 |     |
| Ser | Val | Thr | Ala | Thr | Arg | Ser | Phe | Thr | Val | Lys | Asp | Glu | Gln | Gly | Phe | 195 | 200 | 205 |     |
| Ser | Leu | Phe | Pro | Val | Ile | Gly | Ala | Pro | Ala | Gln | Asn | Glu | Ile | Lys | Glu | 210 | 215 | 220 |     |
| Val | Glu | Ile | Gly | Lys | Asn | Ala | Asn | Leu | Thr | Cys | Ser | Ala | Cys | Phe | Gly | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Lys | Gly | Thr | Gln | Phe | Leu | Ala | Ala | Val | Leu | Trp | Gln | Leu | Asn | Gly | Thr | 245 | 250 | 255 |     |
| Lys | Ile | Thr | Asp | Phe | Gly | Glu | Pro | Arg | Ile | Gln | Gln | Glu | Glu | Gly | Gln | 260 | 265 | 270 |     |
| Asn | Gln | Ser | Phe | Ser | Asn | Gly | Leu | Ala | Cys | Leu | Asp | Met | Val | Leu | Arg | 275 | 280 | 285 |     |
| Ile | Ala | Asp | Val | Lys | Glu | Glu | Asp | Leu | Leu | Leu | Gln | Tyr | Asp | Cys | Leu | 290 | 295 | 300 |     |
| Ala | Leu | Asn | Leu | His | Gly | Leu | Arg | Arg | His | Thr | Val | Arg | Leu | Ser | Arg | 305 | 310 | 315 | 320 |
| Lys | Asn | Pro | Ile | Asp | His | His | Ser | Ile | Tyr | Cys | Ile | Ile | Ala | Val | Cys | 325 | 330 | 335 |     |
| Ser | Val | Phe | Leu | Met | Leu | Ile | Asn | Val | Leu | Val | Ile | Ile | Leu | Lys | Met | 340 | 345 | 350 |     |
| Phe | Trp | Ile | Glu | Ala | Thr | Leu | Leu | Trp | Arg | Asp | Ile | Ala | Lys | Pro | Tyr | 355 | 360 | 365 |     |
| Lys | Thr | Arg | Asn | Asp | Gly | Lys | Leu | Tyr | Asp | Ala | Tyr | Val | Val | Tyr | Pro | 370 | 375 | 380 |     |
| Arg | Asn | Tyr | Lys | Ser | Ser | Thr | Asp | Gly | Ala | Ser | Arg | Val | Glu | His | Phe | 385 | 390 | 395 | 400 |
| Val | His | Gln | Ile | Leu | Pro | Asp | Val | Leu | Glu | Asn | Lys | Cys | Gly | Tyr | Thr |     |     |     |     |

ES 2 603 568 T3

```

405               410               415
Leu Cys Ile Tyr Gly Arg Asp Met Leu Pro Gly Glu Asp Val Val Thr
      420                        425                      430

Ala Val Glu Thr Asn Ile Arg Lys Ser Arg Arg His Ile Phe Ile Leu
      435                        440                      445

Thr Pro Gln Ile Thr His Asn Lys Glu Phe Ala Tyr Glu Gln Glu Val
      450                        455                      460

Ala Leu His Cys Ala Leu Ile Gln Asn Asp Ala Lys Val Ile Leu Ile
      465                        470                      475                      480

Glu Met Glu Ala Leu Ser Glu Leu Asp Met Leu Gln Ala Glu Ala Leu
      485                        490                      495

Gln Asp Ser Leu Gln His Leu Met Lys Val Gln Gly Thr Ile Lys Trp
      500                        505                      510

Arg Glu Asp His Ile Ala Asn Lys Arg Ser Leu Asn Ser Lys Phe Trp
      515                        520                      525

Lys His Val Arg Tyr Cln Met Pro Val Pro Ser Lys Ile Pro Arg Lys
      530                        535                      540

Ala Ser Ser Leu Thr Pro Leu Ala Ala Gln Lys Gln
      545                        550                      555

<210> 13
<211> 328
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 13

Met Gly Phe Trp Ile Leu Ala Ile Leu Thr Ile Leu Met Tyr Ser Thr
1      5      10      15

Ala Ala Lys Phe Ser Lys Gln Ser Trp Gly Leu Glu Asn Glu Ala Leu
      20      25      30

Ile Val Arg Cys Pro Arg Gln Gly Lys Pro Ser Tyr Thr Val Asp Trp
      35      40      45

Tyr Tyr Ser Gln Thr Asn Lys Ser Ile Pro Thr Gln Glu Arg Asn Arg
      50      55      60

Val Phe Ala Ser Gly Gln Leu Leu Lys Phe Leu Pro Ala Ala Val Ala

```

ES 2 603 568 T3

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

5     <210> 14  
       <211> 5428  
       <212> ADN  
       <213> artificial

10 <220>  
<223> Secuencia ADN de pcDNA3.1 (+)

<400> 14

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| gacggatcgg gagatctccc gatccccat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg   | 60   |
| ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg  | 120  |
| cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc  | 180  |
| ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt  | 240  |
| gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata  | 300  |
| tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggttgaccg cccaacgacc  | 360  |
| cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc  | 420  |
| attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt   | 480  |
| atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt  | 540  |
| atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca   | 600  |
| tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg  | 660  |
| actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc  | 720  |
| aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg  | 780  |
| gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca  | 840  |
| ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc   | 900  |
| gtttaaactt aagcttggtta ccgagctcgg atccactagt ccagtgtggt ggaattctgc | 960  |
| agatatccag cacagtggcg gccgctcgag tctagagggc ccgtttaaac ccgctgatca  | 1020 |
| gcctcgactg tgcttctag ttgccagcca tctgtgtgtt gcccctcccc cgtgccttcc   | 1080 |
| ttgaccctgg aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaataaaaatgagga aattgcatcg  | 1140 |
| cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg  | 1200 |
| gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat ggcttctgag  | 1260 |
| gcggaagaa ccagctgggg ctctaggggg tatccccacg cgcctgtag cggcgcatta    | 1320 |
| agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgcctagcg   | 1380 |
| cccgtcctt tcgctttctt ccttccttt ctgcacagc tcgcgggctt tcccgtcaa      | 1440 |
| gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc  | 1500 |

# ES 2 603 568 T3

|            |             |            |             |            |             |      |
|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| aaaaaacttg | attaggggtga | tgggtcacgt | agtgggccaat | cgccttgata | gacgggttttt | 1560 |
| cgccttttga | cgttgagtc   | cacgttcttt | aatagtggac  | tcttgttcca | aactggaaca  | 1620 |
| acactcaacc | ctatctcggg  | ctattctttt | gatttataag  | ggattttgcc | gatttcggcc  | 1680 |
| tattggttaa | aaaatgagct  | gatttaacaa | aaatttaacg  | cgaattaatt | ctgtggaatg  | 1740 |
| tgtgtcagtt | aggggtgtga  | aagtccccag | gctccccagc  | aggcagaagt | atgcaaagca  | 1800 |
| tgcattctca | ttagtcagca  | accaggtgtg | gaaagtcccc  | aggctcccca | gcaggcagaa  | 1860 |
| gtatgcгааг | catgcattct  | aattagtcag | caaccatagt  | cccgcccta  | actccgcca   | 1920 |
| tcccgccct  | aactccgccc  | agttccgccc | attctccgccc | ccatggctga | ctaatttttt  | 1980 |
| ttatttatgc | agagccgag   | gccgcctctg | cctctgagct  | attccagaag | tagtgaggag  | 2040 |
| gcttttttgg | aggcctaggc  | ttttgcaaaa | agctcccggg  | agcttgtata | tccattttcg  | 2100 |
| gatctgatca | agagacagga  | tgaggatcgt | tgcgatgat   | tgaacaagat | ggattgcacg  | 2160 |
| caggttctcc | ggccgcttgg  | gtggagaggc | tattcggcta  | tgactgggca | caacagacaa  | 2220 |
| tccgctgctc | tgatccgccc  | gtgttccggc | tgtcagcgca  | ggggcgcccg | gttctttttg  | 2280 |
| tcaagaccga | cctgtccggg  | gccctgaatg | aactgcagga  | cagggcagcg | cggctatcgt  | 2340 |
| ggctggccac | gacgggctgt  | ccttgccgag | ctgtgctcga  | cgttgtcact | gaagcgggaa  | 2400 |
| gggactggct | gctattgggc  | gaagtgccgg | ggcaggatct  | cctgtcatct | cacottgctc  | 2460 |
| ctgccgagaa | agtatccatc  | atggctgatg | caatgcggcg  | gctgcatacg | cttgatccgg  | 2520 |
| ctacctgcc  | attcgaccac  | caagcgaaac | atcgcatcga  | gcgagcacgt | actcggatgg  | 2580 |
| aagccggtct | tgtcgatcag  | gatgatctgg | acgaagagca  | tcaggggctc | gcgccagccg  | 2640 |
| aactgttcgc | caggctcaag  | gcgcgcatgc | ccgacggcga  | ggatctcgtc | gtgacccatg  | 2700 |
| gcgatgcctg | cttgccgaat  | atcatgggtg | aaaatggccg  | cttttctgga | ttcatcgact  | 2760 |
| gtggccggct | gggtgtggcg  | gaccgctatc | aggacatagc  | gttggctacc | cgtgatattg  | 2820 |
| ctgaagagct | tggcgccgaa  | tgggctgacc | gcttcctcgt  | gctttacggg | atcgcgcctc  | 2880 |
| ccgattcgca | gcgcacgccc  | ttctatcgcc | ttcttgacga  | gttcttctga | gcgggactct  | 2940 |
| ggggttcgaa | atgaccgacc  | aagcgacgcc | caacctgcca  | tcacgagatt | tcgattccac  | 3000 |
| cgcgccttc  | tatgaaagg   | tgggcttcgg | aatcgttttc  | cgggacgccg | gctggatgat  | 3060 |
| cctccagcgc | ggggatctca  | tgttgaggtt | cttcgcccac  | cccaacttgt | ttattgcagc  | 3120 |
| ttataatggt | tacaaataaa  | gcaatagcat | cacaaatttc  | acaaataaag | catttttttc  | 3180 |
| actgcattct | agtttgtggt  | tgtccaaact | catcaatgta  | tcttatcatg | tctgtatacc  | 3240 |
| gtcgacctct | agctagagct  | tggcgtaatc | atggctcatag | ctgtttcctg | tgtgaaattg  | 3300 |
| ttatccgctc | acaattccac  | acaacatacg | agccggaagc  | ataaagtgtg | aagcctgggg  | 3360 |
| tgcctaata  | gtgagctaac  | tcacattaat | tgcgttgccg  | tcactgcccg | ctttccagtc  | 3420 |

# ES 2 603 568 T3

gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt 3480  
 gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct 3540  
 gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga 3600  
 taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc 3660  
 cgcgttgctg gcgtttttcc ataggtccg ccccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg 3720  
 ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt tccccctgg 3780  
 aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt 3840  
 tctcccttgg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg 3900  
 gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg 3960  
 cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact 4020  
 ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcgggtg ctacagagtt 4080  
 cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct 4140  
 gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac 4200  
 cgctggtagc ggtttttttg ttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca 4260  
 agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaaacgaaa actcacgtta 4320  
 agggattttg gtcctgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa 4380  
 atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctctgaca gttaccaatg 4440  
 cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcaccca tagttgcctg 4500  
 actccccgtc gtgtagataa ctacgatagc ggagggctta ccatctggcc ccagtgcctgc 4560  
 aatgataccg cgagaccac gctcacggc tccagattta tcagcaataa accagccagc 4620  
 cggaaagggc gagcgagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa 4680  
 ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc 4740  
 cattgctaca ggcacgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg 4800  
 ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc cccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc 4860  
 cttcggctct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat 4920  
 ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg 4980  
 tgagtactca accaagtcata tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc 5040  
 ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg 5100  
 aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat 5160  
 gtaaccact cggtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg 5220  
 gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga cacggaaatg 5280  
 ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct 5340  
 catgagcgga tacatatctg aatgtattta gaaaaataa caaatagggg ttccgcgcac 5400  
 atttccccga aaagtgccac ctgacgtc 5428

- 5 <210> 15
- <211> 178
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

# ES 2 603 568 T3

<400> 15

Met Lys Pro Lys Met Lys Tyr Ser Thr Asn Lys Ile Ser Thr Ala Lys  
1 5 10 15

Trp Lys Asn Thr Ala Ser Lys Ala Leu Cys Phe Lys Leu Gly Lys Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ala Lys Glu Val Cys Pro Met Tyr Phe Met Lys Leu Arg  
35 40 45

Ser Gly Leu Met Ile Lys Lys Glu Ala Cys Tyr Phe Arg Arg Glu Thr  
50 55 60

Thr Lys Arg Pro Ser Leu Lys Thr Gly Arg Lys His Lys Arg His Leu  
65 70 75 80

Val Leu Ala Ala Cys Gln Gln Gln Ser Thr Val Glu Cys Phe Ala Phe  
85 90 95

Gly Ile Ser Gly Val Gln Lys Tyr Thr Arg Ala Leu His Asp Ser Ser  
100 105 110

Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser Thr  
115 120 125

Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr Glu  
130 135 140

Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys Val Leu  
145 150 155 160

Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly Asp Gly  
165 170 175

Val Asp

5

<210> 16

<211> 92

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 16

# ES 2 603 568 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Lys | Met | Leu | Met | Val | Thr | Leu | Ser | Pro | Thr | Lys | Asp | Phe | Trp | Leu |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| His | Ala | Asn | Asn | Lys | Glu | His | Ser | Val | Glu | Leu | His | Lys | Cys | Glu | Lys |
|     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Pro | Leu | Pro | Asp | Gln | Ala | Phe | Phe | Val | Leu | His | Asn | Met | His | Ser | Asn |
|     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
| Cys | Val | Ser | Phe | Glu | Cys | Lys | Thr | Asp | Pro | Gly | Val | Phe | Ile | Gly | Val |
| 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Lys | Asp | Asn | His | Leu | Ala | Leu | Ile | Lys | Val | Asp | Ser | Ser | Glu | Asn | Leu |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     |     | 80  |     |
| Cys | Thr | Glu | Asn | Ile | Leu | Phe | Lys | Leu | Ser | Glu | Thr |     |     |     |     |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     |     |     |

---

## REIVINDICACIONES

1. Fragmento polipeptídico aislado de la interleucina 33 humana (hIL-33), biológicamente activo, seleccionado de entre los fragmentos que tienen por secuencia los aminoácidos 95 a 270 (SEC ID nº 2), 99 a 270 (SEC ID nº 3) o 109 a 270 (SEC ID nº 4) de la interleucina 33 humana (hIL-33), siendo dichos fragmentos unos productos naturales de escisión de hIL-33 por lo menos por una proteasa de los neutrófilos humanos.
2. Fragmento polipeptídico aislado según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha proteasa de los neutrófilos humanos se selecciona de entre: la cathepsina G (EC 3.4.21.20), la proteinasa 3 de los leucocitos (EC 3.4.21.76), y la elastasa 2 de los neutrófilos (EC 3.4.21.37).
3. Fragmento polipeptídico aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que presenta por lo menos una actividad biológica mejorada con respecto a la interleucina 33 humana (hIL-33).
4. Fragmento polipeptídico aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que presenta por lo menos una actividad biológica mejorada con respecto a la forma truncada que tiene por secuencia los aminoácidos 112 a 270 de hIL-33 (SEC ID nº 5).
5. Ácido nucleico aislado que codifica un fragmento polipeptídico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Vector nucleotídico caracterizado por que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 5.
7. Célula hospedante, caracterizada por que está transformada por un ácido nucleico según la reivindicación 5 o el vector según la reivindicación 6.
8. Fragmento polipeptídico tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización como agonista del receptor ST2.
9. Fragmento polipeptídico tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización como medicamento.
10. Fragmento polipeptídico tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su utilización en el tratamiento de las enfermedades infecciosas como la sepsis, las queratitis debido a *Pseudomonas* o la tuberculosis, infecciones debidas a un nematodo o al virus de la influenza, de la aterosclerosis, de las enfermedades cardiovasculares tales como el infarto del miocardio, del cáncer o de la inflamación de los tejidos adiposos en caso de obesidad.
11. Composición farmacéutica que comprende por lo menos un fragmento polipeptídico aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o el ácido nucleico definido en la reivindicación 5.
12. Utilización de un fragmento polipeptídico aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o del ácido nucleico definido en la reivindicación 5, para diagnosticar una infección o un traumatismo en un individuo.
13. Anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente el fragmento aislado tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
14. Procedimiento de producción de un fragmento polipeptídico aislado tal como se define en las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
  - a) cultivar una célula recombinante tal como se define en la reivindicación 7, en un medio de cultivo y en unas condiciones de cultivo apropiadas,
  - b) aislar el fragmento polipeptídico obtenido en la etapa a).

Figura 1

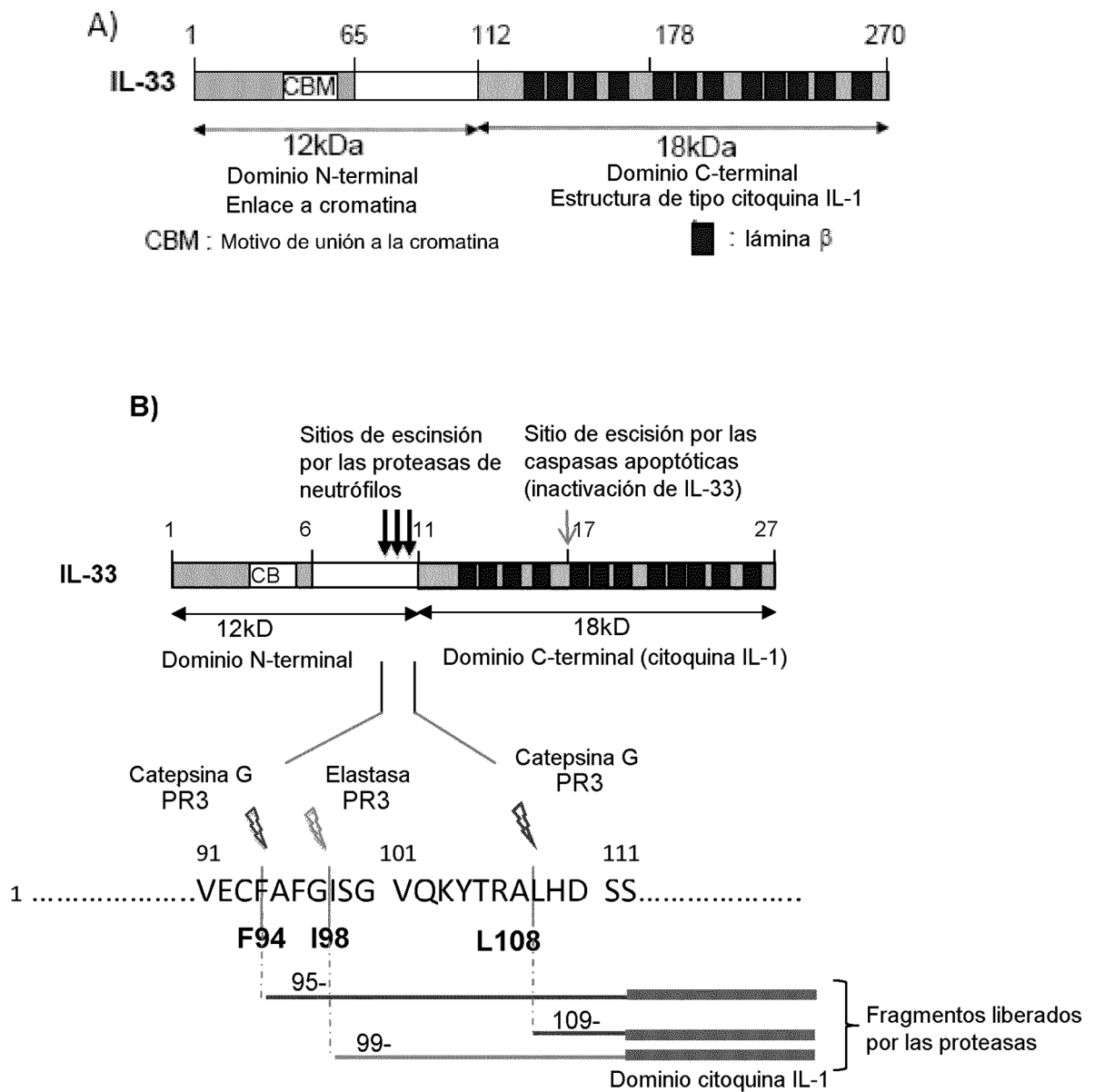


Figura 2

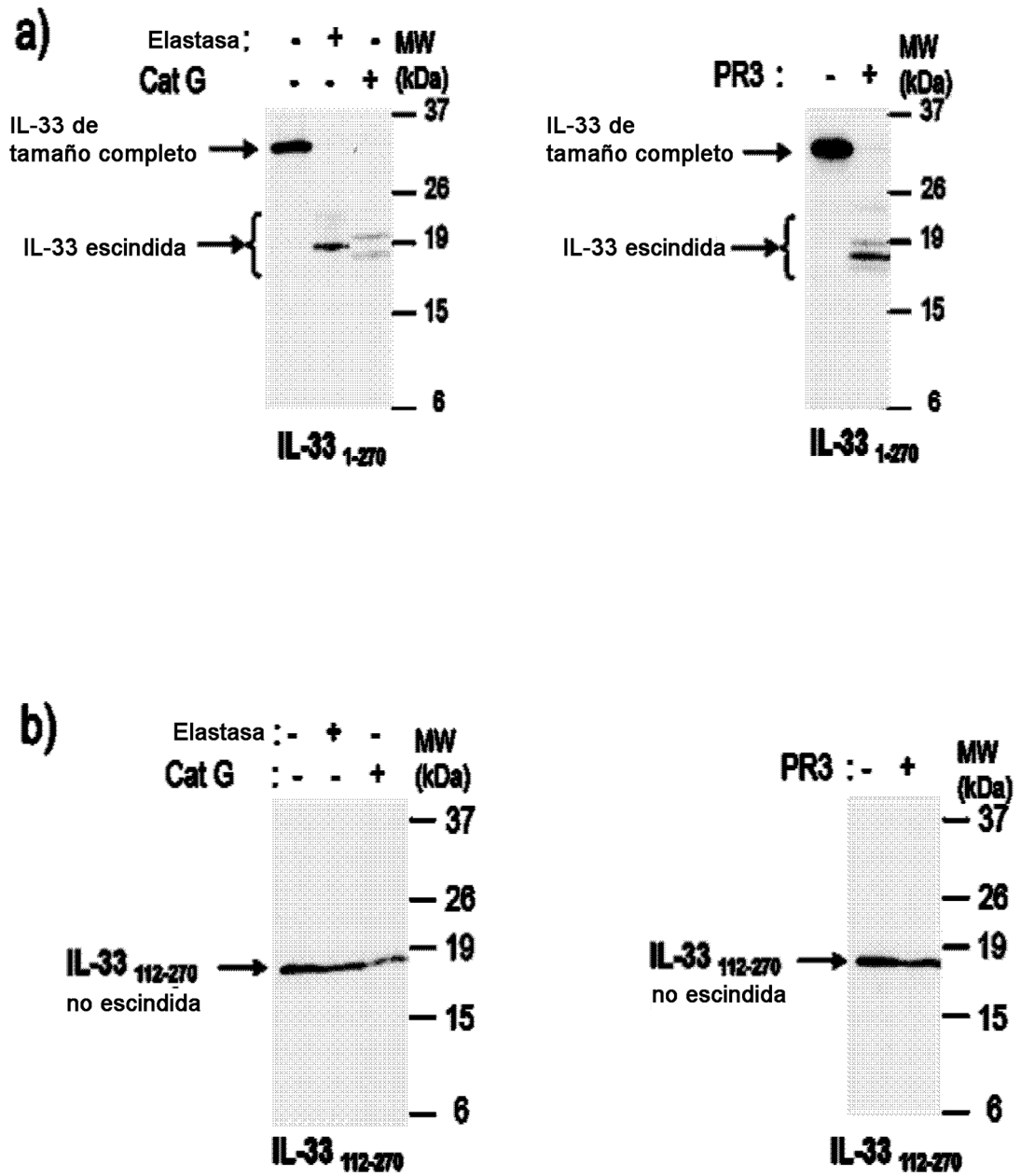


Figura 2 (continuación)

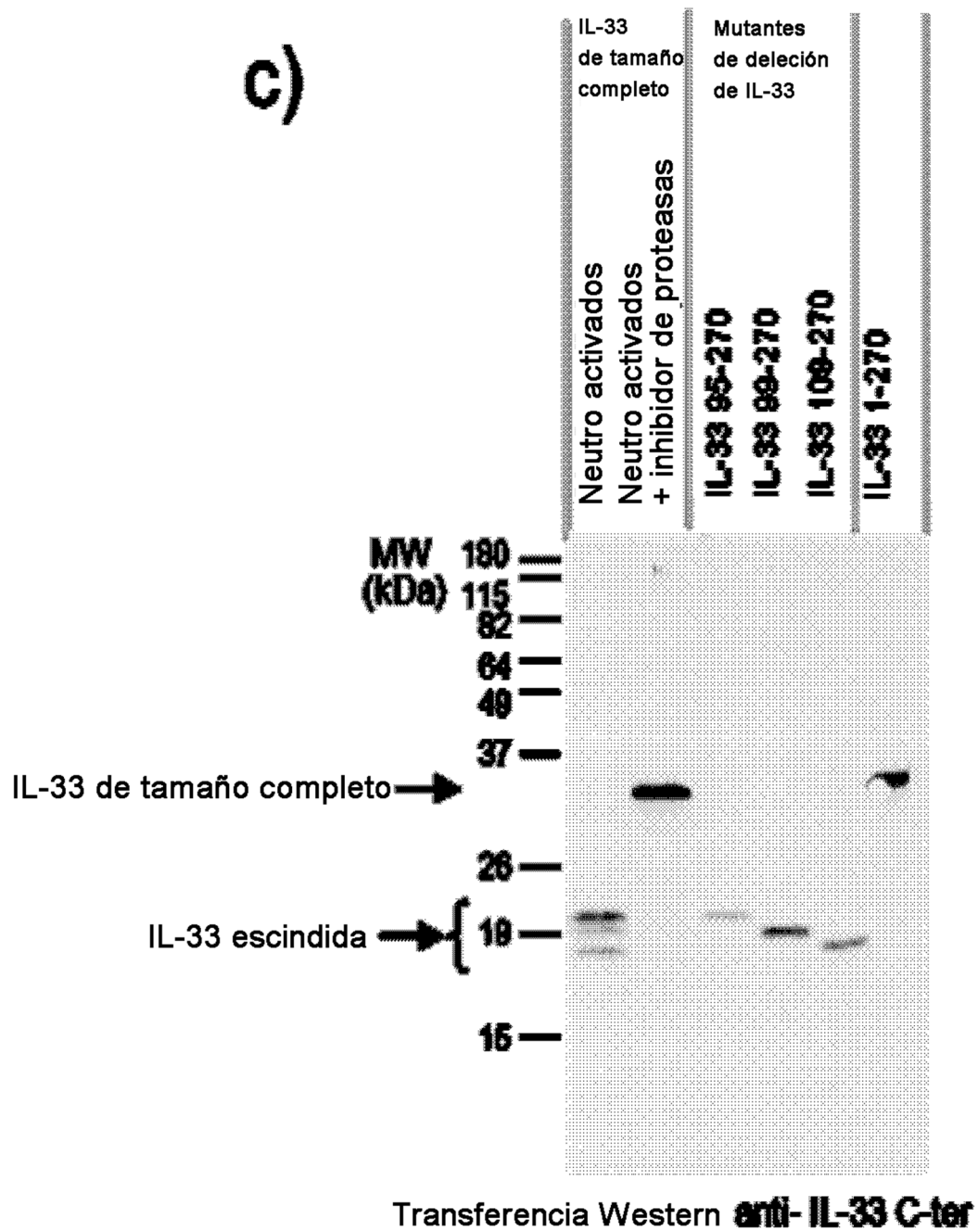
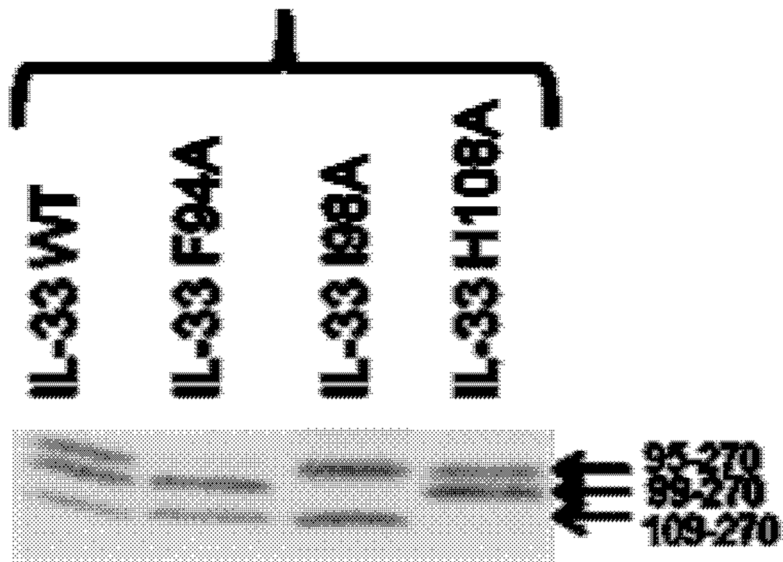


Figura 2 (continuación)

d)

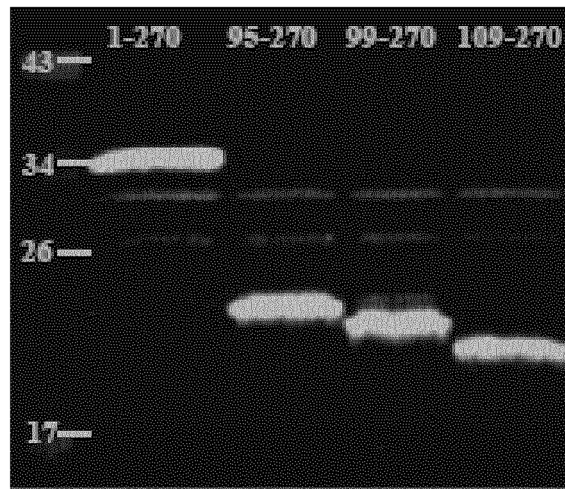
Neutrófilos activados +



Transferencia Western anti-IL-33 C-ter

Figura 3

A)



B)

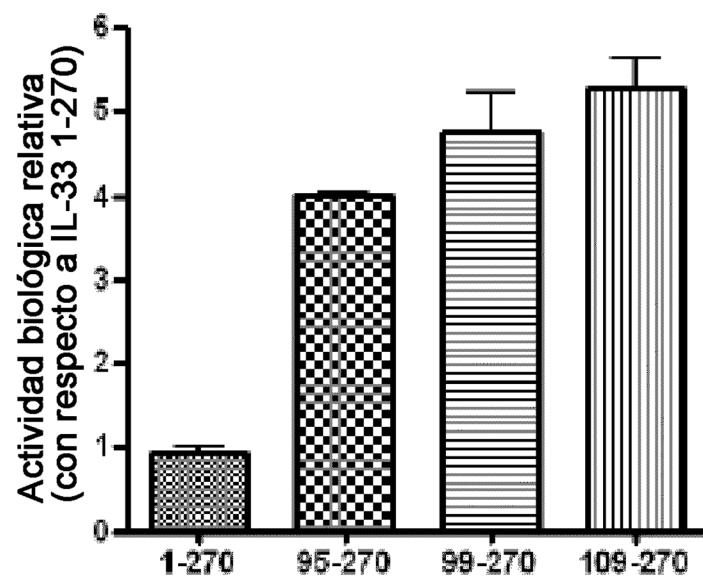


Figura 4

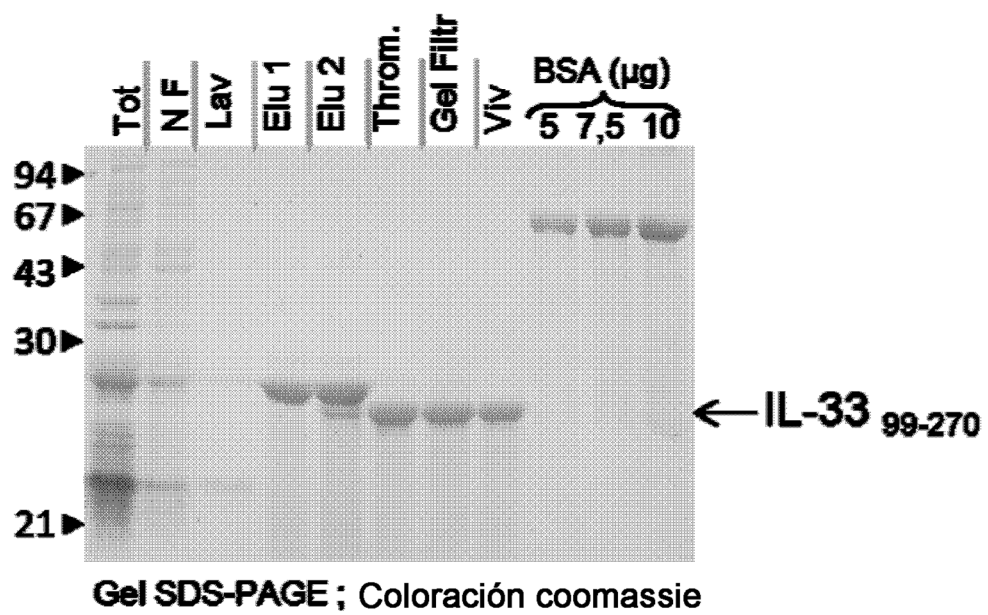
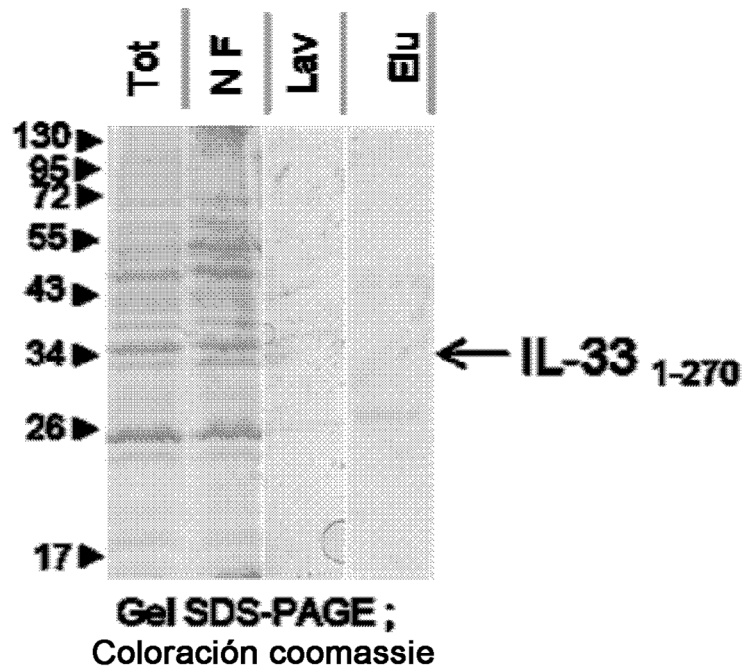


Figura 4 (continuación)

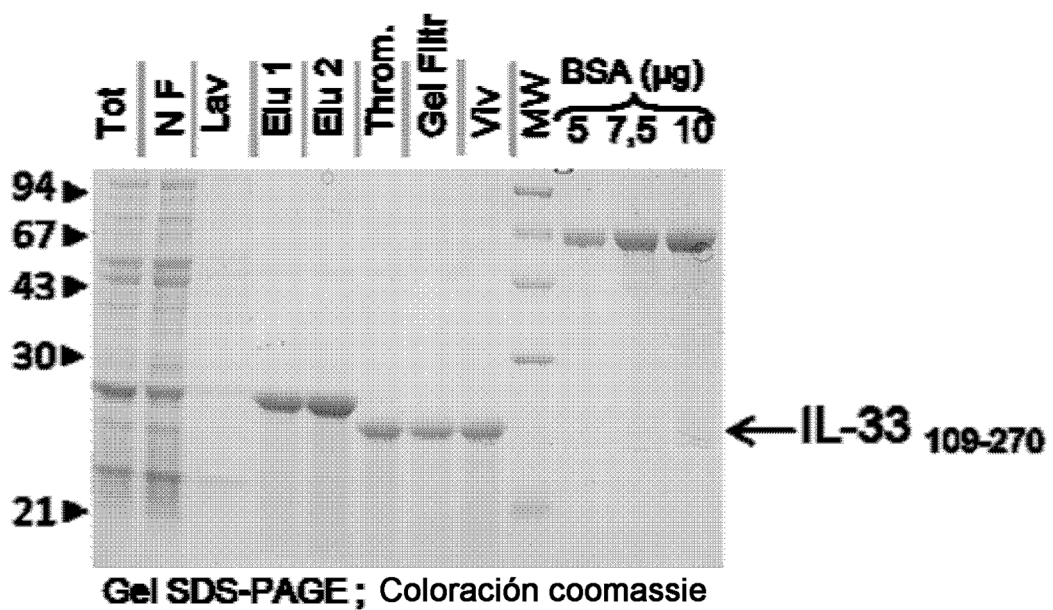
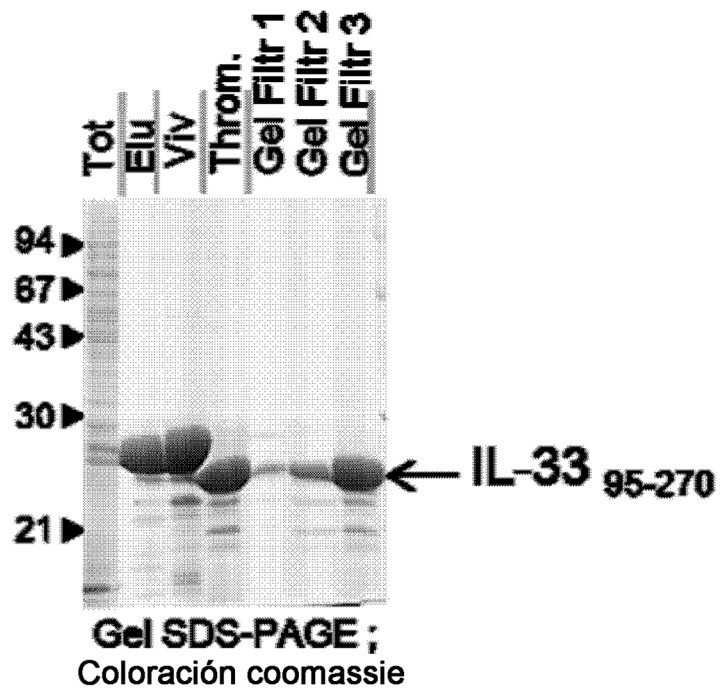


Figura 4 (continuación)

Tota = Total; NF = No fijado; Lav = lavado; Elu = Elución; Throm = Trombina;  
Gel Filtr = Gel filtración; Viv = Vivaspina

| Proteínas recombinantes        | Cantidad obtenida por litro de cultivo | Dosificación endotoxinas |
|--------------------------------|----------------------------------------|--------------------------|
| Human IL-33 <sub>1-270</sub>   | < 1 µg                                 | -                        |
| Human IL-33 <sub>95-270</sub>  | 16 mg                                  | 0,01 U/µg                |
| Human IL-33 <sub>99-270</sub>  | 11 mg                                  | 0,008 U/µg               |
| Human IL-33 <sub>109-270</sub> | 9 mg                                   | 0,004 U/µg               |

Figura 5

A) Bazo

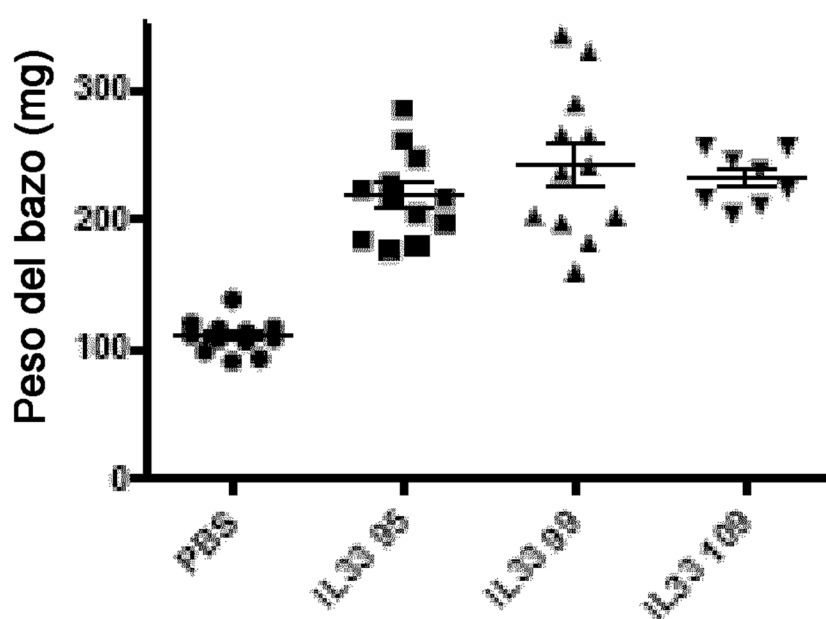
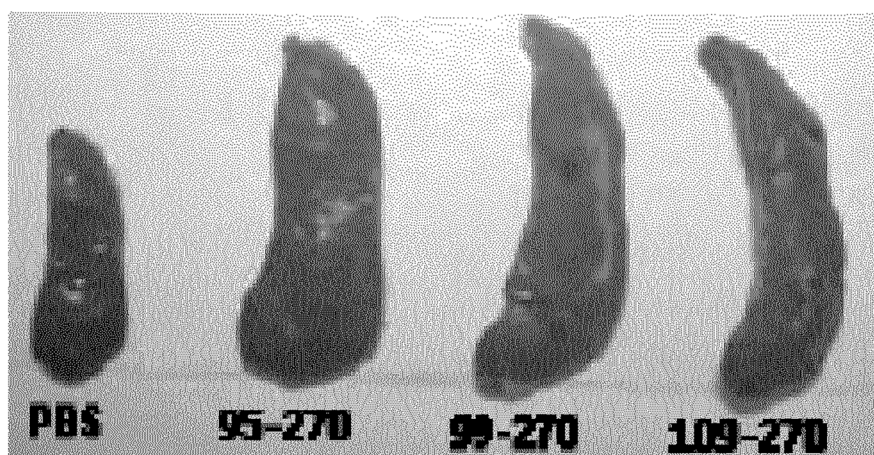


Figura 5 (continuación)

